

**Determinación de la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Bipolaris sorokiniana*,  
agente causal de la Mancha Borrosa en cebada**

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Producción Vegetal.*

**Jorge Andrés Dominguez Sanabria**  
Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de Asunción - 2014

Cátedra de Fitopatología – Facultad de Agronomía (UBA)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

## **COMITÉ CONSEJERO**

Director de tesis

**Marcelo Anibal Carmona**

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (UBA)

Dr. Ciencias Agrarias y Forestales, (UNLP)

Codirector de tesis

**Francisco José Sautua**

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Master di II livello in “Tecnologie della Trasformazione dei Prodotti Agroalimentari”

(Università degli Studi di Perugia)

## **JURADO DE TESIS**

JURADO

**Cristina Alicia Cordo**

Licenciada en Botánica (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

**Román Augusto Serrago**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**Sebastián Alberto Stenglein**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata, La Plata)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 9 de SEPTIEMBRE de 2019

**Declaración:**

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros) y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

Ing. Agr. Jorge Dominguez

## **Dedicatoria:**

Este trabajo de tesis está dedicado:

A Dios todopoderoso, que sin su gracia y bendición nada de esto sería posible.

A **Mi Madre** María Petrona, quien me enseñó que con esfuerzo y sacrificio todo es posible.

## Agradecimientos:

A mi director de tesis Marcelo Carmona, por su amistad, confianza, apoyo necesario y su segura orientación durante estos años compartidos.

A mi co director Francisco Sautua, por la paciencia, los consejos y por las horas invertidas en mi formación profesional.

Al selecto plantel de profesores de la “Escuela Para Graduados Alberto Soriano”, por su calidad educativa.

A Marina Sisterna, por su colaboración con las mediciones morfológicas, a Juan Morella por su ayuda con la aplicación del fungicida en los ensayos *in vivo*, también agradecer a quienes ayudaron a recolectar y enviar las muestras de semillas de cebada: a Mariano Alvarez (Cooperativa Agrícola Ganadera Limitada de Ascensión), Cervecería-Maltería Quilmes, Lucas D’Alessandri (Coopdefensa) y a Fidel Cortese (Ing. Agr. Consultor Privado) que coordino la recolección de dichas muestras.

A los amigos y compañeros que me dio la maestría, Carlos Mejía, Mónica Bogado, Cecilia Pérez y Paolo Sartor por los buenos momentos vividos.

Al programa de becas, “Don Carlos Antonio López”, por darme la oportunidad de formarme en el exterior y sin la cual no hubiera sido posible esta maestría.

A “Goretito”, por cuidar de mi madre durante mi ausencia en la casa, te llevare siempre en el corazón.

Y finalmente agradecer a Natalia Vidal, por acompañarme durante este periodo pese a la distancia y sobre todo por su amor incondicional.

## ÍNDICE GENERAL

Índice general	vi
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
CAPÍTULO I:	16
Introducción general	16
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Importancia de la mancha borrosa en cebada	20
1.2 Sintomatología	21
1.3 Características de <i>B. sorokiniana</i>	22
1.4 Ciclo biológico-agronómico del patógeno	25
1.4.1 Fuente de inóculo	25
1.4.2 Diseminación	25
1.4.3 Transmisión	26
1.4.4 Germinación, penetración y colonización	27
1.4.5 Esporulación	27
1.4.6 Supervivencia	28
1.4.6.1 Semillas	28
1.4.6.2 Rastrojos	29
1.5 Métodos de control de <i>B. sorokiniana</i>	32
1.5.1 Tratamiento químico	32
1.6 Planteo del problema	38
1.7 OBJETIVOS	40
1.7.1 Objetivo general	40
1.7.2 Objetivos particulares	40
1.8 HIPÓTESIS	41
Capítulo II:	17
Sensibilidad micelial de aislados de <i>Bipolaris sorokiniana</i> a fungicidas “ <i>in vitro</i> ”	17

2.1 INTRODUCCIÓN	43
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.2.1 Obtención y caracterización de aislados	44
2.2.2 Determinación de la concentración inhibitoria (CI <sub>50</sub> )	47
2.2.3 Clasificación de la sensibilidad de los aislados de <i>B. sorokiniana</i>	49
2.3 RESULTADOS	50
2.3.1 Descripción morfológica de los aislados	50
2.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria (CI <sub>50</sub> ) para los diferentes fungicidas	52
2.3.3 Clasificación de la sensibilidad de los aislados de <i>B. sorokiniana</i>	55
2.3.4 Sensibilidad de aislados de <i>B. sorokiniana</i> a cinco fungicidas	55
2.4 DISCUSIÓN	66
2.5 CONCLUSIONES	70
Capítulo III:	72
Efecto “ <i>in vivo</i> ” del fungicida sobre dos aislados de <i>Bipolaris sorokiniana</i> en plantas de cebada	72
3.1 INTRODUCCIÓN	73
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	74
3.2.1 Material vegetal	75
3.2.2 Preparación de macetas	76
3.2.3 Preparación del inóculo	77
3.2.4 Inoculación en plantas de cebada	78
3.2.5 Parámetros evaluados y análisis estadístico	81
3.3 RESULTADOS	83
3.3.1 Incidencia, severidad de <i>B. sorokiniana</i> en plantas de cebada y eficacia del control	85
3.3.2 Cuantificación del número y tamaño de lesión	89
3.4 DISCUSIÓN	900
3.5 CONCLUSIÓN	94
Capítulo IV:	95
Conclusiones generales	95
4.1 Síntesis de los principales resultados	96
4.2 Aportes logrados en el conocimiento	98

4.3 Aplicaciones de los resultados	99
4.4 Implicancias para futuras investigaciones	100
Capítulo V:	103
BIBLIOGRAFÍA	103
6. APÉNDICE	129
6.1 Composición de los fungicidas** utilizados:	129
6.1.1 Composición del sustrato** utilizado:	130
6.2 Análisis estadístico	131



## ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1.1</u> Producción de cebada en Argentina y exportaciones	20
<u>Tabla 2.1</u> Aislados de <i>B. sorokiniana</i> utilizados para el ensayo de concentración inhibitoria. Se indica para cada aislado: campaña agrícola, localidad, región de origen, la variedad y la incidencia	46
<u>Tabla 2.2</u> Largo, ancho y número de pseudoseptos de los diferentes aislados de <i>B. sorokiniana</i>	50
<u>Tabla 2.3</u> Características morfológicas de aislados de <i>Bipolaris sorokiniana</i> utilizados en el presente estudio	51
<u>Tabla 2.4</u> Media de $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) para cada fungicida probado para la inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados de <i>B. sorokiniana</i>	53
<u>Tabla 2.5</u> Valores medios de $CI_{50}$ de diez aislados de <i>B. sorokiniana</i> analizado para los cinco fungicidas testeados	55
<u>Tabla 2.6</u> Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) de <i>B. sorokiniana</i> para el fungicida azoxistrobina + cyproconazole	56
<u>Tabla 2.7</u> Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) de <i>B. sorokiniana</i> para el fungicida isopirrazam + azoxistrobina	57
<u>Tabla 2.8</u> Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) de <i>B. sorokiniana</i> para el fungicida trifloxystrobina + prothioconazole	58
<u>Tabla 2.9</u> Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) <i>B. sorokiniana</i> para el fungicida fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole	59
<u>Tabla 2.10</u> Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) <i>B. sorokiniana</i> para el fungicida proticonazole + trifloxystrobina + bixafen	60
<u>Tabla 2.11</u> Factor de reducción de la sensibilidad (FRS) de aislados de <i>B. sorokiniana</i> , para las mezclas de ingredientes activos	65
<u>Tabla 3.1</u> Descripción de los tratamientos	75
<u>Tabla 3.2</u> Efecto de fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole en diferentes momentos de aplicación. Porcentaje de incidencia en planta, severidad en hojas y porcentaje de control evaluadas a los 15 DDI	85

Tabla 3.3 Efecto de fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole sobre el promedio del número de lesiones por cm<sup>2</sup> de hoja y tamaño de lesiones en mm 90

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.1</u> Principales zonas de producción de cebada en Argentina en el 2018. (Fuente: Cortese, 2018)	19
<u>Figura 1.2</u> Lesión foliar causada por <i>B. sorokiniana</i> . (A) mancha borrosa típica; (B) lesiones de forma redondeadas (Fuente: Carmona, M.; Di Núbila, S. 2016)	21
<u>Figura 1.3</u> Distribución mundial del patógeno <i>B. sorokiniana</i> (regiones punteadas) (Gupta <i>et al.</i> , 2018)	23
<u>Figura 1.4</u> Ciclo biológico-agronómico de <i>B. sorokiniana</i> , causante de la mancha borrosa en cebada. (Extraído de Pereyra, 1996)	30
<u>Figura 1.5</u> Evolución de ventas de las diferentes tecnologías (principios activos) utilizadas en la protección de cultivos y futuras proyecciones considerando el periodo 2012-2022 a nivel mundial (no se incluyen biofungicidas ni terapicos de semilla) (Extraído de Fleitas, 2017)	38
<u>Figura 2.1</u> Puntos de muestreo a partir de los cuales se obtuvieron semillas y/o hojas de cebada infectadas con <i>B. sorokiniana</i>	45
<u>Figura 2.2</u> Morfología conidial de los diferentes aislados de <i>B. sorokiniana</i> (A-H) producidos sobre medio de cultivo APG	50
<u>Figura 2.3</u> Diferentes colonias de <i>B. sorokiniana</i> . (A) tipo I, (B) tipo II, (C) tipo III	51
<u>Figura 2.4</u> Efecto fungitóxico de las diferentes concentraciones de ingredientes activos sobre el crecimiento micelial de <i>B. sorokiniana</i> (aislado DB)	54
<u>Figura 2.5</u> Promedio de inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de <i>B. sorokiniana</i> , expuestos a cinco concentraciones de azoxistrobina (20%) + cyproconazole (8%)	61
<u>Figura 2.6</u> Promedio de inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de <i>B. sorokiniana</i> , expuestos a cinco concentraciones de isopyrazam (12,5%) + azoxistrobina (20%)	62
<u>Figura 2.7</u> Promedio de inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de <i>B. sorokiniana</i> , expuestos a cinco concentraciones de trifloxystrobina(15%) + prothioconazole (17,5%)	62
<u>Figura 2.8</u> Promedio de inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de <i>B. sorokiniana</i> , expuestos a cinco concentraciones de fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8,1%) + epoxiconazole (5%)	63
<u>Figura 2.9</u> Promedio de inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de <i>B. sorokiniana</i> , expuestos a cinco concentraciones de prothioconazole (17,5%) + trifloxystrobina (15%) + bixafen (12,5%)	63

<u>Figura 3.1</u> Mezcla de sustrato, proporción 4 de Growmix por 1 de arena fina	76
<u>Figura 3.2</u> Experimento en plantas de cebada inoculada con dos aislados de <i>B. sorokiniana</i> en condiciones de invernáculo	77
<u>Figura 3.3</u> Proceso de preparación de la solución de conidios. (A) Raspado superficial de la colonia; (B) Filtrado de la suspensión de conidios; (C) Aforo con ADE y homogenización de la solución; (D) Pipeteo de la solución de conidios a un hematocitómetro tipo H; (E) Pipeteo de una 1 gota de tensoactivo; (F) Solución ajustada a $1 \times 10^5$ conidios/mL vertida en un atomizador manual	78
<u>Figura 3.4</u> Maceta cubierta con plástico humedecido, creando así un microclima para favorecer las condiciones de infección del patógeno	79
<u>Figura 3.5</u> Aplicación de fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8,1%) + epoxiconazole (5%) a razón de 1,2 L/ha., 24 días post-emergencia de las plantas de cebada (Estado vegetativo Z1.4)	80
<u>Figura 3.6</u> Escala diagramática propuesta por James, 1974 para manchas foliares en trigo y cebada	81
<u>Figura 3.7</u> Cuantificación de lesiones por $\text{cm}^2$ de hoja de cebada causadas por el patógeno <i>B. sorokiniana</i>	82
<u>Figura 3.8</u> Fragmentos de tejido enfermo sometidos a cámara húmeda. (A) Ampliación de lesión con esporulación; (B) Abundante producción de conidios; (C) Conidios característicos de <i>B. sorokiniana</i> (D) Observación de conidios bajo microscopio 40X	83
<u>Figura 3.9</u> Comparación visual de hojas enfermas: bloque A (lado superior) escala diagramática propuesta por Fetch y Steffenson (1999) versus bloque B (lado inferior) hojas de cebada con 15 DDI. Donde; R: resistente; MR: moderadamente resistente; MS: moderadamente susceptible; S: susceptible	84
<u>Figura 3.10</u> Lesiones en hojas causadas por el aislado menos sensible (DB). (A) Testigo sin inoculación; (B) Testigo inoculado con la suspensión conidial (promedio de 24,2 % de severidad); (C) Efecto curativo del fungicida (promedio 3,6 % de severidad); (D) Efecto preventivo del fungicida (severidad < 1 %)	87
<u>Figura 3.11</u> Lesiones en hojas causadas por el aislado más sensible (CB). (E) Testigo sin inoculación; (F) Testigo inoculado con la suspensión conidial (promedio de 21,8 % de severidad); (G) Efecto curativo del fungicida (promedio de 4,8 % de severidad); (H) Efecto preventivo del fungicida (severidad < 1 %)	88

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS**

ADE: Agua destilada esterilizada

ADI: Antes de la inoculación

APG: Agar papa glucosado, medio de cultivo

ANOVA: Análisis de varianza

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria capaz de controlar el 50% de la población

CR: Crecimiento relativo

DDI: Después de la inoculación

EPP: Elementos de protección personal

FRS: Factor de reducción de la sensibilidad

IBE: Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol

IDM: Inhibidores de la desmetilación

ISDH: Inhibidores de la succinato deshidrogenasa

IQE: Inhibidores de la quinona externa

MoA: Mecanismo bioquímico de acción

Tn: Tonelada

**Determinación de la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Bipolaris sorokiniana*  
agente causal de la Mancha borrosa en cebada**

**Resumen:**

El hongo *Bipolaris sorokiniana* es el agente causal de la Mancha Borrosa (MB) de la cebada. En Argentina, durante las últimas campañas agrícolas, esta enfermedad ha incrementado su prevalencia e intensidad en las principales zonas productoras. El objetivo de este trabajo fue estudiar la sensibilidad *in vitro* de diferentes aislados de *B. sorokiniana* a distintos fungicidas; e *in vivo* del aislado más y menos sensible al fungicida más fungitóxico. Un total de 10 aislados, incluyendo una cepa de la campaña 2000/01, fueron caracterizados morfológicamente e incluidos en los estudios de sensibilidad. Los fungicidas incluidos en el presente trabajo fueron: azoxistrobina + cyproconazole; isopyrazam + azoxistrobina; trifloxystrobina + prothioconazole; fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole y prothioconazole + trifloxystrobina + bixafen. La sensibilidad de los aislamientos se determinó mediante la estimación de la  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial, expresada en  $\mu\text{g/mL}$ ). Se preparó agar papa glucosado modificado con las concentraciones crecientes de cada fungicida: 0; 0,01; 0,1; 1; 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados mostraron que hubo una variación significativa en los valores de  $CI_{50}$  entre los fungicidas. Los menores valores de  $CI_{50}$  fueron obtenidos en todos los aislados para los fungicidas que contenían una molécula de carboxamida en su composición química. En condiciones de invernadero, se determinó que el porcentaje de control de la MB con fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole varió entre 73% y 84% para las plantas que se inocularon 24 horas antes y 100% en plantas que se inocularon 24 horas después de la aplicación. Los dos aislados de *B. sorokiniana* mostraron ser altamente sensibles a las mezclas de fungicidas evaluadas. Los valores de  $CI_{50}$  determinados en esta tesis pueden ser utilizados como referencia para futuros trabajos de monitoreo de la sensibilidad de *B. sorokiniana* a estos fungicidas.

**Palabras clave:** concentración inhibitoria, mancha foliar, resistencia, fungicida, *Hordeum distichum*

**Determination of sensitivity to fungicides of *Bipolaris sorokiniana* isolates, causal agent of spot blotch in barley**

**Abstract:**

Spot blotch of barley is caused by the fungus *Bipolaris sorokiniana*. In Argentina, during the last crop seasons, this disease has increased its prevalence and intensity in the main producing areas. The objective of this work was to study the *in vitro* sensitivity of different isolates of *B. sorokiniana* to different fungicides; and the *in vivo* sensitivity of the more and less sensitive isolates to the most fungitoxic fungicide. A total of 10 isolates, including a strain of the 2000/01 crop season, were morphologically characterized and included in the sensitivity studies. The fungicides tested were: azoxystrobin + cyproconazole; isopyrazam + azoxystrobin; trifloxystrobin + prothioconazole; fluxapyroxad + pyraclostrobin + epoxiconazole and prothioconazole + trifloxystrobin + bixafen. The sensitivity of the isolates was determined by estimating the IC<sub>50</sub> (fungicide concentration, expressed as µg/mL, which inhibits mycelial growth by 50% relative to growth in unamended medium). Final concentrations for fungicides in modified potato dextrose agar were: 0; 0.01; 0.1; 1; 10 and 20 µg/mL. The results showed that there was a significant variation in the IC<sub>50</sub> values between the fungicides. The lowest IC<sub>50</sub> values were obtained in all isolates for the fungicides that contained a carboxamide molecule in its chemical composition. Under greenhouse conditions, it was determined that the control of spot blotch with fluxapyroxad + pyraclostrobin + epoxiconazole varied from 73% to 84% for plants that were inoculated 24 hours before and 100% in plants that were inoculated 24 hours after the fungicide application. The two isolates of *B. sorokiniana* were highly sensitive to the fungicide mixtures evaluated. The IC<sub>50</sub> values determined in this thesis could be used as a reference for future work of monitoring the sensitivity of *B. sorokiniana* to fungicides.

**Key words:** inhibitory concentration, leaf spot, resistance, fungicide, *Hordeum distichum*

## **CAPÍTULO I:**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. INTRODUCCIÓN

La cebada es uno de los cereales más antiguos cultivados por el hombre, se cree que su centro de origen es la región situada entre los ríos tigres y Éufrates, en la Mesopotamia (Cano, 1989), aunque existe evidencia que proviene de la región sudeste de Asia (Bellido, 1991).

Es un cereal que tiene una amplia distribución geográfica y adaptación ecológica, encontrándose a 70° latitud Norte en Noruega hasta 17°5' Latitud Sur, en Mali, con alturas sobre el nivel del mar de hasta 4500 m (Arias, 1995).

La cebada fue introducida en América por Cristóbal Colón, en 1493, junto con el trigo. Posteriormente, durante la colonización de las Américas fueron hechas innumerables introducciones de diversas especies, especialmente de trigo para alimentación y cebada para forraje. Su cultivo se extendió por América del Sur en el inicio del siglo XVI, superando en parte al cultivo de trigo, amaranthus y quinoa en los Andes (Arias, 1995).

La cebada cultivada pertenece a la especie *Hordeum vulgare* L. *sensu latu*, y se divide en 3 subespecies, *Hordeum vulgare* L. subsp. *spontaneum* Kch. (de raquis frágil, silvestre en general), *Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. o *Hordeum vulgare* L. var. *hexastichum* L. (cebada de 6 hileras, en la cual todas las flores de cada nodo son raquis fértil), *Hordeum vulgare* L. var. *distichum* L. (cebada de 2 hileras, en que cada nodo del raquis, la flor de la espiguilla central es fértil y las laterales son estériles). Son todas plantas herbáceas, anuales, y hermafroditas de fecundación autógama. (Cano, 1989; Mundstock, 1983).

En términos prácticos, la cebada se clasifica de acuerdo con el uso a que se destina (cervecera o forraje) y el tipo de espiguilla (de dos y seis hileras). En general, los cultivares de 6 hileras son consideradas forrajeras, es decir, producen abundantes masas verde y sus granos por lo general tienen un mayor porcentaje de proteínas, siendo apropiados para la alimentación animal. Cuando mayor es el porcentaje de proteínas se torna del tipo indeseable para la industria maltera, que exige niveles proteicos más bajos (entre 10 y 12%) (Baldanzi, 1988).

En Argentina la cebada que se emplea para la elaboración de cerveza se denomina *Hordeum vulgare* L. var. *distichum* L. mientras que la que se usa como forraje para la

alimentación animal se denomina *Hordeum vulgare* L. var. *hexastichum* L. (Ibarguren, 2014).

No se conoce una fecha exacta del inicio de este cultivo en la Argentina, pero en 1875 se la cita por primera vez en la estadística de exportación con 2 toneladas (SINAVIMO, 2015). En aquella época se las mencionaba como cebadas, es decir, sin especificar si eran forrajeras o cerveceras. Hace relativamente pocos años que en las estadísticas de producción se comienzan a especificar los dos tipos de cebada por separado como exigencia de los compradores y por fijarse precio diferencial entre ellas (Tomaso, 2008).

Los primeros datos estadísticos oficiales de superficie sembrada y producción comenzaron a publicarse en 1909, arrojando una superficie de 60.000 ha (se supone que en su mayor parte eran forrajeras). También los antecedentes de la industria maltero-cervecera se remontan a principios de siglo cuando la empresa Quilmes comienza a desarrollar sus actividades (Tomaso, 2008).

En la actualidad, los nuevos ambientes explorados por el cultivo en Argentina son principalmente el centro norte y sudeste de la provincia de Buenos Aires, oeste de Bs As. y la Pampa (Fig. 1.1). La variedad Andreia ocupa alrededor del 80% de la producción nacional. Shakira es la segunda variedad, pero en retroceso. Se espera para 2019 un incremento en superficie de nuevos cultivares como Danielle, Montoya, Overture, Jennifer, Aliciaana y Sinfonía. (Cattaneo, 2019).

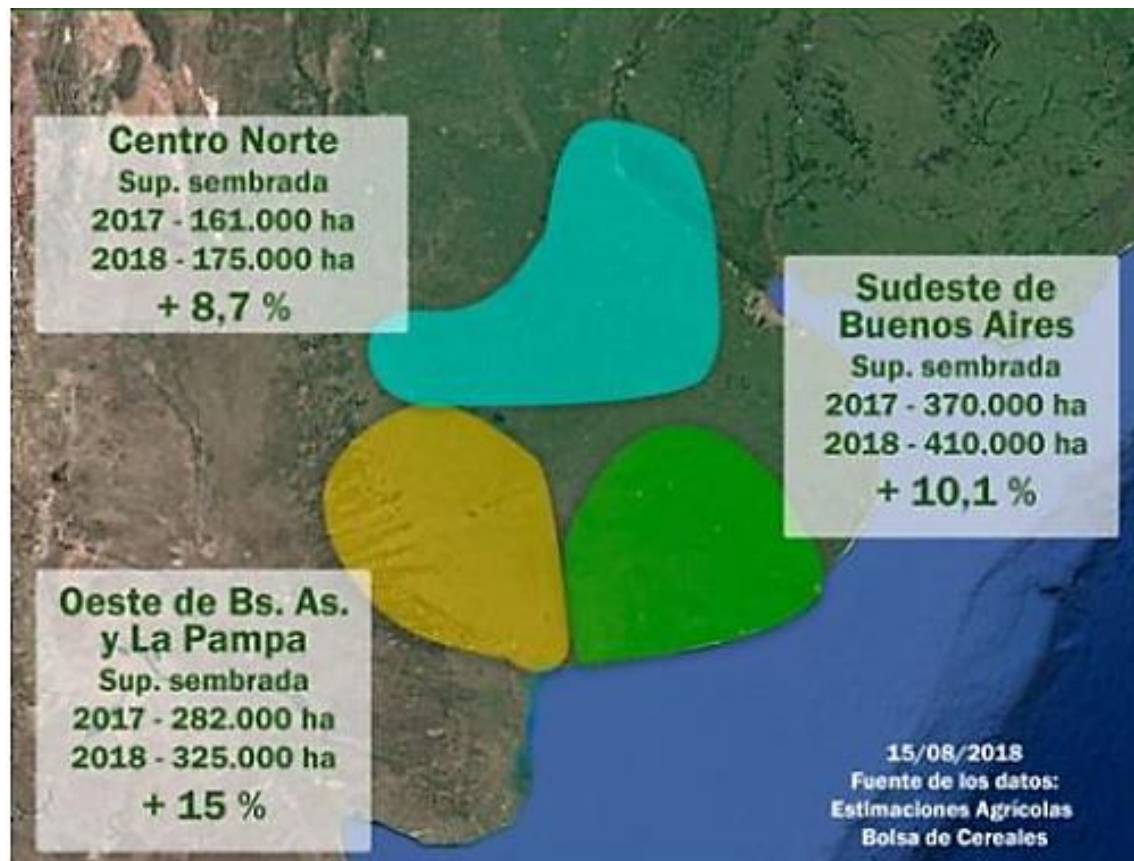


Figura 1.1 Principales zonas de producción de cebada en Argentina en el 2018. (Fuente: Cortese, 2018)

En la campaña 2017/18 la producción nacional alcanzó las 3.700.000 Tn, siendo este volumen un 14 % mayor a la campaña 2016/17, en la que se cosecharon 3.200.000 Tn (SAGPyA, 2019). Cabe señalar que en la campaña 2012/13 se alcanzó un volumen record de 5.158.190 Tn (Tabla 1.1) (Bolsa de Comercio de Rosario, 2017).

**Tabla 1.1** Producción de cebada en Argentina y exportaciones

Año agrícola	Producción (Tn)	Exportación (Tn)	
		Cervecera	Forrajera
2009/10	1.700.000	400.000	100.000
2010/11	2.700.000	1.100.000	400.000
2011/12	4.400.000	1.100.000	1.700.000
2012/13	5.000.000	800.000	2.900.000
2013/14	5.050.000	900.000	2.300.000
2014/15	2.800.000	850.000	600.000
2015/16	4.700.000	1.000.000	1.700.000
2016/17	3.200.000	900.000	1.100.000
2017/18	3.700.000	1.150.000	1.300.000
2018/19*	4.500.000	1.100.000	1.700.000

\*Estimado. (Fuente: [cevadacervecera.com.ar](http://cevadacervecera.com.ar), 2019)

### 1.1 Importancia de la mancha borrosa en cebada

Los patógenos afectan el rendimiento y disminuyen la calidad industrial y maltera de los granos de cebada (Carmona, 2008). La cebada se ve afectada por varias enfermedades entre las que se destacan como frecuentes las manchas foliares, principalmente, Mancha en red (*Pyrenophora teres*), Mancha marrón o borrosa (*Bipolaris sorokiniana*), Escaldadura (*Rhynchosporium secalis*) y Salpicado necrótico (*Ramularia collo-cygni*) (Carmona y Sautua, 2015, 2016). En la actualidad, las manchas foliares constituyen las principales, registrándose alta prevalencia de las mismas en todas las regiones cerealeras de Argentina. Las pérdidas ocasionadas por las enfermedades foliares varían de acuerdo con las condiciones climáticas de cada año particular y con la susceptibilidad de los genotipos sembrados.

En la Argentina, la Mancha borrosa (MB) está presente y en incremento, pero su importancia relativa es menor con respecto a las manchas foliares causadas por *P. teres*, *R. secalis* y *R. collo-cygni* (Carmona y Sautua, 2015). Puede causar la muerte de plántulas especialmente a partir de semilla infectada (Acharya, 2011). Afecta todos los órganos aéreos de la planta a lo largo del ciclo de cultivo. Los síntomas son más evidentes después de la espigazón, dando manchas en hojas, nudos, tallos y gluma

(Carmona y Sautua, 2016). Las lesiones son marrones sin contornos definidos (borrosa) (Fig. 1.2), de forma oval o redondeadas. A veces de centro claro y bordes marrones oscuros (Carmona y Sautua, 2015).



**Figura 1.2** Lesión foliar causada por *B. sorokiniana*. (A) mancha borrosa típica; (B) lesiones de forma redondeadas (Fuente: Carmona, M.; Di Núbila, S. 2016).

## 1.2 Sintomatología

Los síntomas se manifiestan primeramente en las plántulas, originadas a partir de semillas infectadas con el patógeno. El hongo crece a partir de la semilla y coloniza el coleóptilo, en el cual aparecen lesiones castaño-oscuras. Si el micelio penetra y se desarrolla en el interior del coleóptilo, las manchas se podrán observar sobre la plúmula (Wiese, 1977; Reis, 1988a).

En plantas adultas, las manchas se pueden desarrollar sobre hojas, vainas, nudos y a veces, en los entrenudos. Los síntomas en las hojas se presentan típicamente en forma de pequeñas manchas foliares, redondeadas o fusiformes, llegando a medir hasta un poco más de 2 x 20 mm, de coloración marrón a marrón-oscuro con márgenes cloróticos. Las manchas generalmente están restringidas por las nervaduras de las hojas, sin embargo, en algunos casos, pueden continuar creciendo y coalescer, formando grandes lesiones que cubren grandes áreas de la hoja. Elevados niveles de infección pueden provocar la senescencia prematura de las hojas. Las manchas viejas generalmente presentan una apariencia de color negro-oliváceo en el centro de la lesión, que corresponden a la esporulación del hongo. En plántulas, las lesiones son similares a las encontradas en planta adulta, pero generalmente son más redondeadas.

En las espigas, *B. sorokiniana* puede atacar las glumas, lema, pálea, raquis y granos, los que quedan arrugados, sin peso y con el síntoma característico denominado punta negra. El oscurecimiento parcial o total del grano también puede ser observado en el caso de infecciones más intensas (Picinini y Fernandes, 1999), el cual puede rodear el grano y extenderse hasta la base de la lema (Jhonston, 1997).

Otro tipo de enfermedad causada por *B. sorokiniana* en cebada es la pudrición radicular, caracterizada por lesiones pequeñas, ovaladas y marrones sobre las raíces primarias y secundarias, en el mesocótilo (también llamado entrenudo subcoronal) y en la corona de la planta. Estas infecciones son originadas a partir de conidios presentes en el suelo o del micelio presente en semillas (Mathre, 1982). El ataque de la enfermedad en estadíos iniciales de la plántula puede causar su muerte, reduciendo la densidad del cultivo (Piening, 1997).

Los síntomas secundarios de la pudrición radicular en partes aéreas de las plantas son pocos visibles. Estos se caracterizan principalmente por la reducción del vigor de las plantas y la consecuente reducción de su tamaño, menor tamaño de las espigas y por la muerte de macollos. Cultivos severamente infectados son menos densos a causa de la muerte de plántulas después de la siembra y de la muerte de macollos secundarios, resultando en un menor número de espigas. Las plantas infectadas presentan un aspecto de deficiencia nutricional, menor porte y tallos finos que se quiebran con facilidad (Diehl, 1980; 1982).

En general, los daños producidos por *B. sorokiniana* en el cultivo de cebada se traducen en la disminución de la germinación, reducción en el rendimiento y en la calidad de los granos y de la malta (Carmona y Sautua, 2015). Además de eso, el hecho de tener la capacidad de infectar y ser transmitida por la semilla, hace que el hongo tenga importancia potencial para el cultivo de cebada, sobre todo cuando las condiciones ambientales se presentan favorables al desarrollo de la enfermedad.

### **1.3 Características de *B. sorokiniana***

La mancha marrón, también llamada helmintosporiosis o punta negra de los granos (Reis, 1988a) es causado por el hongo *B. sorokiniana*. El género *Bipolaris* incluye un número significativo de fitopatógenos con distribución mundial. Estas especies son comúnmente asociadas con manchas foliares, tizones foliares, pudrición de la raíz, entre

otros síntomas, principalmente en cultivos de campo de la familia Poaceae, incluyendo arroz, maíz, trigo, cebada y sorgo (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987; Berbee *et al.*, 1999). Las enfermedades devastadoras causadas por especies de *Bipolaris* en cultivos importantes como el arroz y el trigo, han sido la causa de hambrunas históricas que han provocado la inanición de grandes poblaciones humanas en varias regiones del mundo. Por ejemplo, la hambruna de Bengala en la India (1943-1944) fue el resultado de una enfermedad causada por *Bipolaris oryzae* en el cultivo de arroz (Ou, 1985; Scheffer, 1997). El tizón de la hoja de maíz del sur causada por *Bipolaris maydis* causó pérdidas catastróficas en los cultivos de maíz en EE.UU. y Reino Unido en la década de 1970 (Ullstrup, 1972; Carson, 1998; Levet *et al.*, 1999; Manamgoda *et al.*, 2011). En la conferencia "El trigo para las zonas cálidas Nacionales", celebrada en Brasil en 1990, *B. sorokiniana*, causante de la pudrición de la raíz y la mancha foliar del trigo y la cebada, fue declarado el patógeno foliar más importante desde el punto de vista económico en regiones cálidas de todo el mundo (Duveiller y Gilchrist, 1994). Además de estar asociadas a hospedantes de la familia Poaceae, se sabe que existen especies de *Bipolaris* en al menos 60 familias entre ellos, Anacardiaceae, Araceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rutaceae y Zingiberaceae como saprófitas o patógenos. (Ellis, 1971, Sivanesan, 1987 y Manamgoda *et al.*, 2011). La distribución mundial de las especies fitopatógenas comunes de *Bipolaris* (Fig. 1.3), puede deberse a la transferencia de productos agrícolas, incluidas plantas y semillas, a través de fronteras geográficas (Farr y Rossman, 2013; Zhang *et al.*, 2013).



Figura 1.3 Distribución mundial del patógeno *B. sorokiniana* (regiones punteadas) (Extraído de Gupta *et al.*, 2018).

*Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok) Shoemaker, pertenece a la división Deuteromycota, clase Hyphomycetes, orden Moniliales y familia Dematiaceae, sinonimia *Helmintosporium sativum* Pammel, King y Bakke, *Helmintosporium sorokinianum* Sacc. in Sorok, *Dreschlera sorokiniana* (Sacc.) Subran. y Jain, teniendo como fase sexual a *Cochliobolus sativus* (Ito y Kurib) Drechsl. ex Dastur, de la división Ascomycota, clase Loculoascomycetes, orden Pleosporales, familia Pleosporaceae, raramente encontrado en la naturaleza y sólo en condiciones de laboratorio (Alcorn, 1988; Noyd, 2000).

*Bipolaris sorokiniana* presenta conidióforos solitarios o en grupos, rectos o flexibles, algunas veces geniculados, color marrón a marrón oscuro, septados, con dimensiones promedio de 100-400 µm x 6-8 µm o, según Ellis (1971), por encima de 220 µm de longitud y 6-10 µm de ancho. Los conidios jóvenes son sub-hialinos, pero más tarde se tornan de color amarillo-verdoso a marrón oliváceo oscuro, curvados y cuando son sembrados en medio de cultivo frecuentemente se presentan rectos, fusiformes o ligeramente elipsoides. Miden en promedio 80-170 µm x 12-24 µm y tienen de 4 a 10 septos (Manamgoda *et al.*, 2014; Zillinsky, 1984). Wiese (1987) describe medidas de 6-8 x 110-150 µm para los conidióforos y 15-20 x 60-120 µm para los conidios, con 3-4 pseudoseptos. Ellis (1971) reporta medidas de 40-120 (más común 60-100) µm de longitud, 17-28 (más común 18-23) µm de ancho y 3-12 (más común 6-10) pseudoseptos. Los conidios germinan por uno o ambos polos, el primer septo es producido delimitando 1/3 basal del conidio y el hilo es externo (Muchovej *et al.*, 1988).

En la fase teleomófica o sexual, el hongo se denomina *Cochliobolus sativus* Dreschsler ex Dastur, un ascomiceto de rara ocurrencia. Los pseudotecios son negros, globosos, con 300-400 µm en diámetro y con 50-200 µm de longitud. Los ascos son clavados y miden de 20-45 x 120-250 µm y contienen de 4 a 8 ascosporos encurvados. Las ascosporas son hialinas, filiformes, afinadas en las extremidades y miden 6-9 x 160-360 µm (Ellis, 1971; Mehta, 1978; Wiese, 1987).



## **1.4 Ciclo biológico-agronómico del patógeno**

### **1.4.1 Fuente de inóculo**

Las fuentes de inóculos primarias son las semillas, los restos culturales infestados, las plantas voluntarias, los hospedantes secundarios y los conidios libres durmientes en el suelo (Reis y Casa, 1988) (Fig. 3).

La semilla infectada por *B. sorokiniana* es una de las fuentes de inóculos más importantes para este patógeno, constituyendo una fuente de inóculo para las pudriciones radicales, seminales, mesocótilos, raíces secundarias y para lesiones en las primeras hojas (Reis *et al.*, 1999).

Una vez introducido en una nueva área por medio de la semilla el hongo parasita el cultivo para, posteriormente luego de la cosecha, permanecer nutriéndose de los restos culturales de los cereales de invierno (Reis y Baier, 1983), donde producirá abundante inóculo. Los restos de plantas voluntarias constituyen también una fuente importante de inóculo primario (Reis, 1988a).

Otra fuente de inóculo primario de *B. sorokiniana* es el suelo, conteniendo conidios durmientes en forma libre, originados principalmente de los restos culturales dejados en la superficie del suelo. Se han reportado investigaciones que relacionan este tipo de inóculo como el principal causante de pudriciones radicales (Chinn, 1976; Piening, 1997). Un aspecto importante a resaltar es la distribución de conidios en el perfil del suelo. El 90% de los propágulos viables fueron encontrados en los primeros 10 cm de profundidad, y solamente el 1 % entre 20 y 30 cm (Duczek, 1981; Reis y Abrão, 1983; Barba, 2001).

### **1.4.2 Diseminación**

El hongo *B. sorokiniana* puede ser diseminado pasivamente por propágulos adheridos externamente a la superficie de la semilla (infestada), o llevados internamente en los tejidos de la semilla (infectada), a través del micelio durmiente en el pericarpio, en el endospermo o en el embrión (Reis, 1987; Rashid *et al.*, 1997). Por esta razón, la semilla es considerada el más importante y eficiente vehículo de transmisión y diseminación pasiva directa de los patógenos (Reis, 1988a; Machado, 1982). A través de la semilla, el patógeno es transportado a largas distancias, entre países, estados, regiones o campos (Carmona *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 1999) y consecuentemente introducido en cultivos

libres de patógenos o de razas más virulentas todavía no existentes (Reis, 1988a; Tanaka y Machado, 1985).

Durante la estación de crecimiento del cultivo de cebada, el principal agente de diseminación pasiva indirecta dentro de un lote es el viento (Reis 1984; Reis, 1988a). Sin embargo, como las esporas son relativamente pesadas, el transporte ocurre a cortas distancias, que oscilan entre 50 a 200 m (Reis, 1994). Asimismo, el salpicado por lluvia y el viento favorece la dispersión dentro de los lotes, siempre a cortas distancias, dado que los conidios son relativamente grandes y pesados (Kiehr *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2001; Carmona y Sautua 2015). Tanto los conidios como las ascosporas (extremadamente raro en la naturaleza) son infectivas y al llegar a la superficie verde de la planta, inicia el proceso de infección en presencia de agua libre, siendo el período de mojado requerido de 6 a 48 horas (Reis *et al.*, 2001; Wiese, 1987; Barba, 2001).

### 1.4.3 Transmisión

Inmediatamente después de la siembra, la semilla se hidrata dando inicio a los procesos de germinación y emergencia de la plántula de cebada. Al mismo tiempo, el patógeno, que se encontraba en el pericarpio, en el embrión (Rashid *et al.*, 1997) o en el endospermo de la semilla (Reis, 1988a; Rashid *et al.*, 1997), pasa del estado de dormancia al de crecimiento vegetativo, exteriorizándose en la superficie de la cariósida (Reis, 1988a; Reis y Casa, 1998). El micelio afecta el coleóptilo, creciendo en su superficie hasta alcanzar la extremidad localizada afuera del suelo. La plúmula puede ser infectada por la penetración del micelio en el coleóptilo. Cuando la plúmula es infectada, se observan lesiones características en la lámina de la hoja, pudiendo ocurrir, algunas veces, deformaciones o anomalías de plántulas emergidas de semillas infectadas (Reis, 1988; Rashid *et al.*, 1997; Rashid, 1998). De esa forma el patógeno es introducido y establecido en una nueva área.

En la parte subterránea, durante la germinación y emergencia, el micelio del hongo crece en la superficie de la semilla hasta infectar las raíces seminales, que son colonizadas, y también el coleóptilo, en el cual produce lesiones (Reis, 1981; Reis; 1982b). A medida que las plantas se desarrollan en condiciones de alta humedad y temperatura (18-30 °C) (Piening, 1997), la colonización del hongo prosigue, infectando desde las coronas hasta alcanzar las hojas basales, las cuales mueren prematuramente.

#### 1.4.4 Germinación, penetración y colonización

El proceso de infección se inicia con la germinación de la espora, seguida por el elongamiento del tubo germinativo y por la formación del apresorio (Carmona *et al.*, 1999). Según Bisen y Channy (1983), la germinación de espora se completa en un período de 4 horas, en condiciones controladas de humedad, mientras que el apresorio se forma después de 8 horas, a menudo encima de la unión de las células epidérmicas. Para Khan *et al.*, (1992), el proceso de germinación, emisión del tubo germinativo y penetración puede llevar más tiempo (36, 48 y 96 horas respectivamente), dependiendo de la resistencia genética del cultivar. Por otro lado, otros autores sugieren que además de la penetración directa vía apresorios (Carmona *et al.*, 1999), el hongo puede también utilizar aberturas estomáticas.

El hongo generalmente penetra en las células a partir del apresorio, mediante un fino tubo de penetración, el cual, internamente, produce una vesícula. A partir de esta vesícula, se forman hifas secundarias que invaden el mesófilo intercelular (Larenz *et al.*, 1986; Piening, 1997). Según Bisen y Channy (1983), el citoplasma de la célula se torna granular en 24 horas después de la patogénesis. Durante la colonización, el micelio invade las células vegetales extrayendo nutrientes provocando la muerte por la acción parasitaria y por la producción de toxinas (Carmona *et al.*, 1999). Como resultado de ello, sobre los órganos infectados se observan síntomas de la enfermedad.

#### 1.4.5 Esporulación

*B. sorokiniana* es un hongo hemibiotrófico (patógeno que forma inicialmente una asociación biotrófica con células vivas del hospedante, y que luego se vuelve necrotrófico), que puede crecer sobre tejido vivo y sobrevivir sobre tejido muerto (restos culturales) de cebada y otros cereales como trigo, utilizándolos como fuente nutricional (Kumar *et al.*, 2002b; Schäfer *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2018); y por eso, solamente esporula en tales tejidos (Reis, 1987; Reis *et al.*, 1988; Reis y Casa, 1998).

En este sentido, la esporulación en órganos aéreos es inexistente en los estadíos iniciales de desarrollo del cultivo, cuando todavía no hay tejidos necrosados. Sin embargo, a medida que surgen, debido a la acción del patógeno, se inicia la multiplicación del hongo. Según Mehta (1981), la máxima producción de conidios ocurre de 22 a 32 días después de la inoculación en condiciones climáticas favorables, siendo que, en la fase de maduración, el inóculo se torna abundante en el aire (Reis y Santos, 1985). Esto

favorece la infección a las hojas superiores, glumas y semillas en desarrollo (Reis, 1988a). El pico máximo de esporulación se alcanza durante y después de la cosecha (Reis y Santos, 1987). En este punto, cuando se completa el ciclo de crecimiento de la planta, el patógeno infecta o infesta nuevamente las semillas. Después de la cosecha, las semillas infectadas son almacenadas, garantizando la supervivencia segura del patógeno (Reis, 1988a).

La esporulación continuará sobre los restos culturales, declinando posteriormente a medida que aquellos se van degradando, a consecuencia de la baja habilidad de competición saprofita que presenta *B. sorokiniana* en el suelo (Reis y Medeiros, 1995; Barba, 2001).

#### **1.4.6 Supervivencia**

*B. sorokiniana*, para garantizar su supervivencia en ausencia de tejido susceptible del hospedante, desarrolla varias estrategias.

##### **1.4.6.1 Semillas**

La asociación patógeno-semilla representa la manera más evolucionada y, por tanto, el refugio más seguro y eficiente para garantizar la supervivencia de los fitopatógenos (Reis, 1987; Reis y Casa, 1998). El hongo *B. sorokiniana* sobrevive en el período entre cosechas en semillas infectadas almacenadas, donde permanece en estado de dormancia debido al bajo contenido de agua en la semilla (12 a 13%), durante ese periodo, que dura aproximadamente seis meses, el patógeno pierde parcialmente su viabilidad (Vechiato *et al.*, 1987; Reis, 1988a; Barba, 2001).

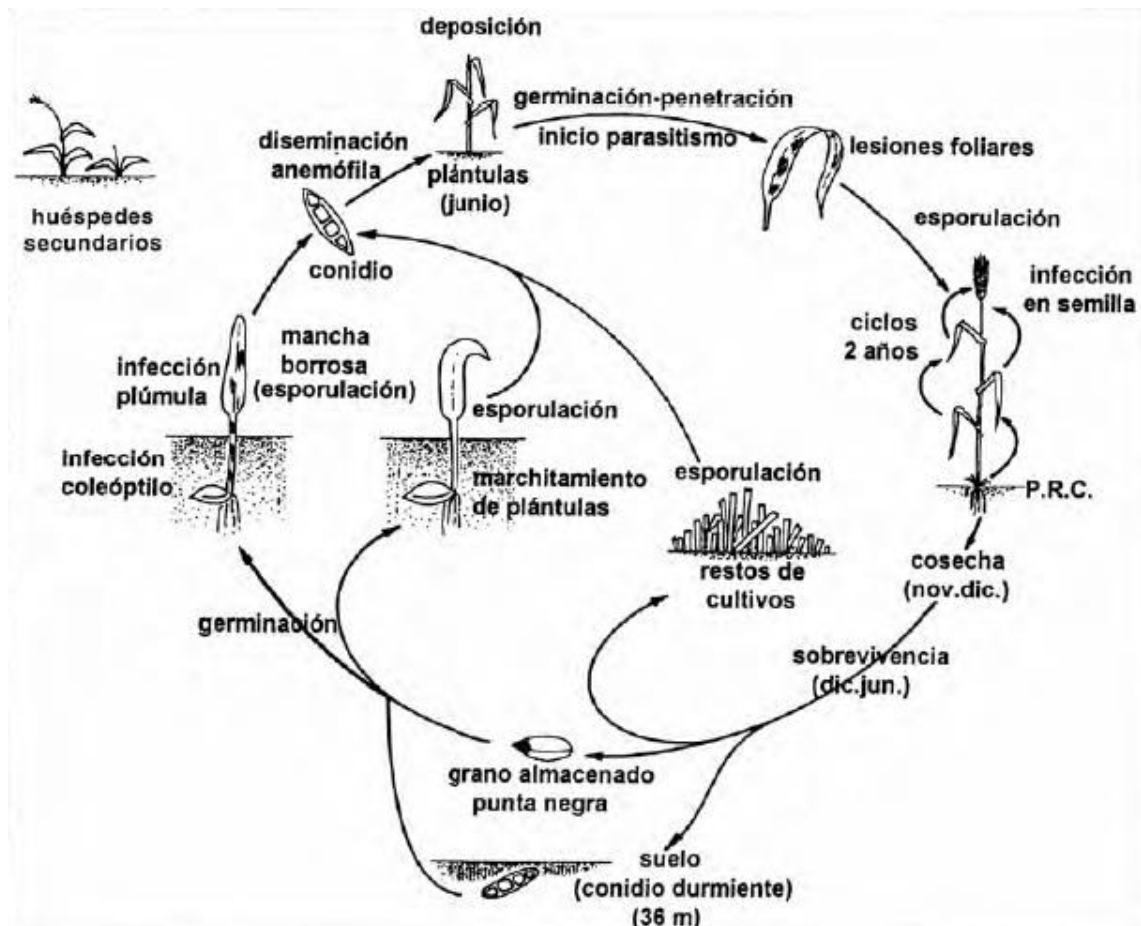
Lutey y Christensen (1963) demostraron que la longevidad de *B. sorokiniana* es altamente dependiente de las condiciones de humedad de la semilla y de la temperatura ambiente. Semillas de cebada almacenadas con 14% de humedad entre 20 a 30 °C sufrieron una merma total de viabilidad del hongo en 24 y 16 semanas, respectivamente, mientras que, con 12% de humedad a 30 °C, el hongo sobrevivió por 53 semanas. Valores extremos de longevidad de *B. sorokiniana* en semillas, en la forma de micelio durmiente, son mencionados por Machacek y Wallace (1952), y por Russell (1958), con 9 y 15 años, respectivamente.

#### 1.4.6.2 Rastrojos

*B. sorokiniana* esporula solamente sobre tejidos muertos, es decir, sobre los restos de cultivos infectados, donde ocurre abundante producción de inóculo. Con el transcurrir del tiempo, la esporulación disminuye como consecuencia de la baja o habilidad parcial de competencia saprofítica del hongo en el suelo (Ghurde, 1966). La bibliografía reporta que la colonización por el hongo tiene más éxito en tejidos vegetales verdes de los hospedantes que sobre tejidos necrosados (Khatskevich y Benken, 1987).

La supervivencia del hongo en los restos de cultivos es garantizada en campos donde se practica el monocultivo, especialmente en siembra directa, sistema en el cual la totalidad del rastrojo permanece en la superficie del suelo por más tiempo hasta su completa degradación, favoreciendo la aparición y la intensidad de este patógeno (Reis *et al.*, 1999). Según Khatskevich y Benken (1987), la intensidad de la esporulación de *B. sorokiniana* sobre rastrojo depende de la temperatura, de la humedad relativa, de la aireación y de factores bióticos del suelo.

Por otro lado, *B. sorokiniana* tiene la capacidad de sobrevivir en rastrojos (Fig. 1.4) de otras especies vegetales de importancia económica utilizadas en rotación de cultivos con cereales de invierno, tales como la soja (Reis *et al.*, 1985a; Reis *et al.*, 1985b; Fernandez y Fernandez, 1990; Fernandez *et al.*, 1993) y el maíz (Francis y Burgess, 1975; Fernandez *et al.*, 1993). Según Sturz y Bernier (1987) y Fernandez *et al.* (1993), el tiempo de supervivencia del hongo sobre rastrojo de cereales de invierno es mayor que sobre residuos de otras especies (< 14 meses).



**Figura 1.4** Ciclo biológico-agronómico de *B. sorokiniana*, causante de la mancha borrosa en cebada. (Extraído de Pereyra, 1996).

#### 1.4.6.3 Hospedantes secundarios

Además de los principales cereales de invierno (cebada, avena, centeno, trigo y triticale), el hongo también puede infectar gramíneas forrajeras, invasoras y nativas donde los cereales de invierno son cultivados, produciendo lesiones en órganos radicales y tejidos foliares senescentes (Reis, 1982b; Diehl, 1983; Reis *et al.*, 1985a; Barba, 2001).

*B. sorokiniana* también ha sido reportado parasitando tejidos foliares en otros cereales de importancia económica, como arroz (Kodama *et al.*, 1979), maíz (Mensah y Zwatz, 1975; Leonard *et al.*, 1988) y sorgo (Frezzi, 1978).

El hongo no es un parásito exclusivo de gramíneas, teniendo la posibilidad de parasitar otras especies, como las dicotiledóneas, entre ellas soja (Cabrera *et al.*, 2010), zanahoria

(Nowicki, 1995) el perejil (Nowicki, 1997), frijol (Lacicowa y Machowicz, 1974), alfalfa y especies de trébol (Tinline, 1988).

#### **1.4.6.4 Conidios latentes en el suelo**

Los conidios en el suelo constituyen la principal estructura de supervivencia de *B. sorokiniana* (Chinn y Tinline, 1964). La baja habilidad de competencia saprofítica impide su supervivencia como micelio, colonizando saprofiticamente los restos culturales (Reis, 1988a). La mayoría de las esporas que caen en el suelo se torna durmientes debido a la micostasis del suelo (Old, 1967), fenómeno que evita la germinación de los conidios en ausencia del hospedante.

Experimentos demostraron que las esporas de *B. sorokiniana* pueden permanecer durmientes (viables) en el suelo hasta 37 meses (Reis, 1989). Chinn y Ledingham (1958) observaron que el periodo de dormancia puede ser largo, llegando a superar los 20 meses. Boosalis (1962) menciona que el periodo es más corto, oscilando entre los 10 a 13 mes.

En general, la longevidad de los conidios durmientes en el suelo depende de factores ambientales (Old, 1967; Khatskevich y Benken, 1987), factores edáficos (Old y Robertson, 1970; Durnina *et al.*, 1980; Fradkin y Patrick, 1985) y factores bióticos inherentes al suelo (Old, 1967; Anderson y Patrick, 1980; Chakraborty y Old, 1982; Fradkin y Patrick, 1985).

#### **1.4.6.5 Estructura de resistencia: clamidosporas**

Las clamidosporas son esporas producidas asexualmente como resultado de modificaciones estructurales de segmentos hifalicos vegetativos o de células conidiales que poseen pared celular gruesa, constituida principalmente por material resintetizado, teniendo como función principal la supervivencia en el suelo (Reis, 1987).

Meronuck y Pepper (1968) reportaron la formación de clamidosporas en las células internas de algunos conidios de *B. sorokiniana* cuando son depositados en el suelo. Observaron también que esas estructuras tienen la capacidad de germinar (emisión de tubo germinativo) después de algunos meses (3 a 5 meses) de haber permanecido en el suelo. En condiciones de laboratorio, Valim-Labres *et al.*, (1998) informaron por primera vez la formación de clamidosporas en hifas de *B. sorokiniana*, cuando el hongo

fue cultivado en medio poco nutritivo. En ambas situaciones, los autores sugieren que la formación de clamidosporas podría ser un mecanismo de supervivencia del hongo en condiciones desfavorables o en la ausencia de un hospedante susceptible. Sin embargo, es importante señalar que la formación de estructuras de resistencia de *B. sorokiniana* es todavía un fenómeno poco esclarecido y, hasta el día de hoy, no se ha investigado en condiciones naturales.

### **1.5 Métodos de control de *B. sorokiniana***

Los principales métodos de control de las enfermedades causadas por *B. sorokiniana* son, la rotación de cultivos, la eliminación de restos culturales, el uso de cultivares resistentes y la aplicación de fungicidas (Carmona y Sautua, 2015). Los nuevos cultivares mejorados genéticamente que fueron introducidos al mercado presentaban mayor productividad, ya que poseían resistencia a enfermedades. Sin embargo, con el pasar de los años surgieron nuevas razas y variantes de diferentes hongos, como por ejemplo *B. sorokiniana*, rompiendo así la resistencia y reduciendo la productividad (Cunha y Trombini, 1999).

Los fungicidas son frecuentemente utilizados en el control de fitopatógenos debido a su facilidad de aplicación y resultados inmediatos. Sin embargo, el uso continuo de estos productos puede aumentar las posibilidades de generación de resistencia por parte de los hongos fitopatógenos. Extensas áreas tratadas con el mismo ingrediente activo aumentan la presión de selección. Además, cuanto menor sea el tiempo en que un patógeno completa su ciclo de vida, más frecuente es la exposición al fungicida y mayor el riesgo de resistencia (Ghini y Kimati, 2000).

#### **1.5.1 Tratamiento químico**

Los fungicidas son sustancias químicas de origen natural o sintético que cuando son aplicadas a las plantas protegen de la penetración y/o posterior desarrollo de hongos patógenos y microorganismos pertenecientes al reino Stramenopila en sus tejidos. Este concepto ha sido ampliado con el surgimiento de nuevas sustancias químicas, que controlan enfermedades causadas por hongos, que no actúan directamente sobre el agente causal de la enfermedad, sino que actúa como activadores de mecanismos de defensas de las plantas (Ghini y kimati, 2000; Nojosa *et al.*, 2005; Reis *et al.* 2007; Reis *et al.*, 2016; Reis y Carmona, 2013).



La fungitoxicidad es una propiedad inherente a la sustancia química y se caracteriza por la toxicidad a los hongos en bajas concentraciones (Reis *et al.*, 2007; Reis y Carmona, 2013). Toxicidad es la capacidad que una sustancia química presenta de producir un efecto nocivo sobre el sistema biológico, alterando funciones o llevando al organismo a la muerte, sobre determinadas condiciones de exposición (Oga *et al.*, 2008).

El uso de fungicidas es uno de los métodos de manejo de enfermedades en plantas más implementados, ya sea por la facilidad de uso, así como por resultados inmediatos, pero su uso constante puede promover la selección de hongos resistentes o tolerantes, especialmente si se aplican durante un largo período de tiempo, poniendo en peligro la eficiencia del método (Ghini y Kimati, 2000).

El principio de tratamiento químico se basa en el desarrollo de productos fungitóxicos contra los patógenos, que tengan baja fitotoxicidad y sean lo menos tóxicos posibles para los seres humanos y el medio ambiente (Menten, 1996).

Según Picinini y Fernandes (1999), en cebada, el tratamiento químico de semillas tiene por objetivo impedir el pasaje de hongos hacia el sistema radicular y partes aéreas de las plantas, tales como *B. sorokiniana* y *P. teres*, evitando así la propagación de la enfermedad. Según Maude (1983), la eliminación completa o erradicación del patógeno es difícil y a veces no es siempre necesaria, porque en muchos casos la reducción del nivel de infección en semillas por debajo de un umbral que no causa pérdidas económicas, es suficiente.

Por otro lado, los productos con acción protectora son aquellos que inhiben la germinación de esporas, impidiendo la penetración del patógeno al hospedante. Por ejemplo, el tiram, aunque es eficaz matando las esporas superficiales y retardando el crecimiento o erradicación del micelio (*in vitro*), no es efectivo cuando este se localiza internamente en la semilla (Luz y Linhares, 1983). Lasca *et al.*, (2001) probaron la eficacia de veinte fungicidas en el control de *B. sorokiniana* y *Pyricularia grisea* en semillas de trigo, donde los fungicidas iprodione y carbendazim fueron los más eficientes.

En experimentos de laboratorio y campo, usando fungicidas en mezclas e individuales, Lacicowa y Pieta, (1994) observaron que el triadimenol + imazalil y tebuconazole + imazalil fueron las combinaciones que lograron el mejor control de *B. sorokiniana*.

Estos resultados corroboran los obtenidos por Lacicowa *et al.*, (1993), principalmente en relación al triadimenol + imazalil y triadimenol. Es importante, señalar que en ninguno de los estudios anteriormente mencionados fue posible erradicar el hongo de la semilla.

Reis y Casa (1998) y Reis *et al.*, (1999) afirman que la erradicación de patógenos en semillas es una tarea difícil, ya que, para que el tratamiento sea efectivo, el fungicida debe ser capaz de eliminar la infección interna de la semilla sin dañar sus tejidos ni afectar negativamente a la germinación. Los autores añaden que la sutura longitudinal de semillas de trigo, centeno y cebada es un obstáculo físico-morfológico en la acción fungicida erradicante de la mayoría de productos. Similar resultado fue informado por Carmona *et al.*, (2001) para *P. teres* en cebada.

Trabajo realizado por Picinini y Fernandes (1999), en condiciones de laboratorio (*in vitro*), mostraron que los fungicidas difenoconazole, difenoconazole + iprodione y triadimenol + iprodione fueron eficientes en la reducción o erradicación del hongo *B. sorokiniana* de semillas de cebada (96 a 100 % de control), mientras que triadimenol mostró un comportamiento variable en su eficiencia, que van desde 40 a 80%.

### **1.5.2 Moléculas utilizadas para el manejo químico en enfermedades de cebada**

En Argentina los triazoles, las estrobilurinas y las carboxamidas y sus mezclas son los principios activos más utilizados para controlar enfermedades foliares en trigo y en otros cereales de invierno de importancia como la cebada (Carmona y Sautua, 2015; Fleitas, 2017).

#### **1.5.2.1 Triazoles**

Son inhibidores de la des-metilación (IDM) (internacionalmente conocidos como DMIs, del inglés Sterol Demethylation Inhibitors), o inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE). Actúan en la formación y selectividad de la membrana plasmática, son agentes sistémicos y funcionan como protectores, curativos y erradicantes, aunque su principal función es la de ser curativos (post infección, antes de la aparición de los síntomas). Sin embargo, no son altamente efectivos para inhibir la germinación de esporas, ya que este proceso depende de sustancias de reserva que permiten la germinación en ausencia de biosíntesis de este lípido (Hewitt, 1998; Reis *et al.*, 2010; Reis y Carmona, 2013; Reis y Carmona, 2013; Carmona y Sautua, 2016).

### 1.5.2.2 Triazolinthionas

Este grupo de principios activos también pertenece al grupo de los IDM o IBE, pero no es un triazol clásico o común, sino una triazolinthiona, es decir, posee un átomo de azufre en el anillo triazol, que el resto de los triazoles no posee, y que luego de ingresado a la planta sufre una modificación, transformándose en su forma activa, el prothioconazole-desthio (Parker *et al.*, 2011, 2013). Dentro de este grupo se conoce el prothioconazole. Esta molécula actúa como competidor directo del sustrato (eburicol) de la enzima lanosterol desmetilasa (codificada por el gen *cyp51*) (Parker *et al.*, 2013). Por el contrario, los triazoles comunes actúan como inhibidores competitivos, uniéndose al grupo hemo de la mencionada enzima (Parker *et al.*, 2011). De esta manera, el prothioconazole se lo considera una nueva generación de IBE dentro de los IDM. También es necesario considerar que esta molécula fue recién registrada en Argentina para el control de enfermedades en cereales en agosto del 2015. Por lo tanto, por su comportamiento a campo y por su menor tiempo en el mercado (menor tiempo de exposición a los hongos), tiene mejor comportamiento que el resto de los IBE, y es el que mejor se comportaría dentro de este grupo contra *Ramularia collo-cygni* (Oxley, 2004; Oxley y Hunter, 2005; Carmona y Sautua, 2016).

### 1.5.2.3 Estrobilurinas

Los principios activos que químicamente pertenecen a la familia de las estrobilurinas inhiben la respiración mitocondrial por el bloqueo de la transferencia de electrones en el complejo citocromo-bc1 (complejo III). Por lo tanto, siendo su sitio de acción específico el anillo de quinona del transportador de electrones denominado coenzima Q, se conocen internacionalmente como Qols (del inglés Quinone Outside Inhibitors). Este principio activo es clasificado como de acción unisito o sitio específico. En general, las esporas de los hongos son más sensibles a las estrobilurinas que el propio micelio, y es por ello que se las consideran moléculas protectoras, inhibiendo la germinación de esporas. El principal inconveniente de las estrobilurinas es el alto riesgo de generar resistencia en los hongos, cuando se usa frecuentemente, a bajas dosis y en forma individual (Reis *et al.*, 2010; Reis y Carmona, 2013; Carmona y Sautua, 2016).

Las estrobilurinas, además de su actividad antifúngica, poseen la propiedad de inhibir la síntesis de etileno en la planta retrasando la senescencia de las hojas. En este sentido, Dimmock y Gooding, (2002) hallaron que la inclusión de estrobilurinas en los fungicidas para el control de enfermedades foliares en trigo, está asociada a aumentos

en el rendimiento en grano, peso específico del grano y peso de mil granos como resultado de la prolongación del periodo fotosintéticamente activo de la hoja bandera. Por su parte, Wu y Von Tiedemann, (2001) sostienen que este retraso en la senescencia, se debería a que las estrobilurinas protegen a los tejidos de las especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno) y por lo tanto existiría un menor estrés oxidativo en el tejido de la planta.

#### **1.5.2.4 Mezcla de estrobilurinas y triazoles**

Con la necesidad de combinar diferentes mecanismos bioquímicos de acción (MoA), aumentar el espectro de acción y reducir el riesgo de resistencia de los hongos a las estrobilurinas, la utilización de estrobilurinas asociadas con triazoles marco un nuevo concepto en la protección química de los cultivos (Reis *et al.*, 2010; Reis y Carmona, 2013). Mediante esta mezcla se logró aumentar, no solo el espectro de acción sino también el periodo de protección, en numerosos y variados cultivos. Estas mezclas representan una evolución en el uso de fungicida y supo combinar diferentes movimientos de las moléculas en la planta con diferentes MoA. Actualmente las recomendaciones para usar mezclas se están generalizando año tras año, ya que el uso de triazoles o de estrobilurinas en forma individual han demostrado que han perdido efectividad para el control de algunas enfermedades, debido a la generación de resistencia (FRAC, 2012; Carmona y Sautua, 2016).

#### **1.5.2.5 Carboxamidas**

Los principios activos que químicamente pertenecen a la familia de las carboxamidas inhiben la respiración mitocondrial por el bloqueo de la transferencia de electrones en el complejo mitocondrial II, específicamente inhibiendo la succinato deshidrogenasa, ISDH (Reis *et al.*, 2010; Reis y Carmona, 2013). Por lo tanto, se conocen internacionalmente como SDHIs (del inglés Succinate Dehydrogenase Inhibitors). Este complejo enzimático, que se encuentra adherido a la membrana mitocondrial interna, participa tanto de la cadena de transporte de electrones como del ciclo de Krebs. Por lo tanto, las carboxamidas trabajan de manera muy similar a las estrobilurinas, anulando los sistemas de producción de energía sobre los cuales los hongos se basan para crecer y proliferar. Esta es la razón por la cual las carboxamidas también se comportan de manera protectora o preventiva, al ser más eficientes en la inhibición de la germinación de esporas de los hongos. También poseen actividad persistente al interactuar con diferentes componentes foliares de la planta. Este principio activo es clasificado como

de acción unisito o sitio específico. Asimismo, poseen un alto riesgo de generar resistencia en los hongos cuando se usa frecuentemente, a bajas dosis y en forma individual (Carmona y Sautua, 2016; FRAC, 2018).

Estudios recientes (Smith *et al.*, 2013) han demostrado que el aumento del rendimiento en un cultivo tratado con carboxamidas (fluxapyroxad) supera al que puede explicarse simplemente a través de un buen control de la enfermedad. La evidencia obtenida recientemente por estos autores, sugiere que además de controlar los síntomas visibles de la enfermedad, la carboxamida fluxapyroxad es capaz de ejercer efectos positivos sobre la fisiología de la planta que involucran un aumento de la duración del tejido fotosintéticamente activo, un retraso en la senescencia y un incremento en la tasa de fotosíntesis. Asimismo, Berdugo *et al.*, (2012) verificaron que otro inhibidor de la SDH (bixafen) demoró la senescencia de espigas y hojas durante el llenado de grano, lo que resultó en mayores rendimientos. Sin embargo, esta evidencia fue obtenida en condiciones controladas que distan mucho de las condiciones reales a campo donde las plantas crecen en comunidad bajo el efecto de estreses bióticos y abióticos que pueden ser muy fluctuantes. Asimismo, Ajigboye *et al.* (2014) encontraron que, en ausencia de enfermedad, una mezcla de triazol y carboxamida (epoxiconazole + isopyrazam, respectivamente), incrementó la eficiencia del Fotosistema II, asociado con una mejora del intercambio gaseoso de la fotosíntesis e incremento en la tasa de transporte de electrones, lo que derivó en aumentos de la biomasa y el rendimiento de grano.

#### **1.5.2.6 Mezcla de carboxamidas más estrobilurinas**

Al igual con las mezclas de estrobilurinas más triazoles, las mezclas de estrobilurinas más carboxamidas aumentan no solo el espectro de acción sino también el periodo de protección y aumentan la eficiencia de control. Ambas moléculas presentan muy buena acción preventiva o protectora (Carmona y Sautua, 2016).

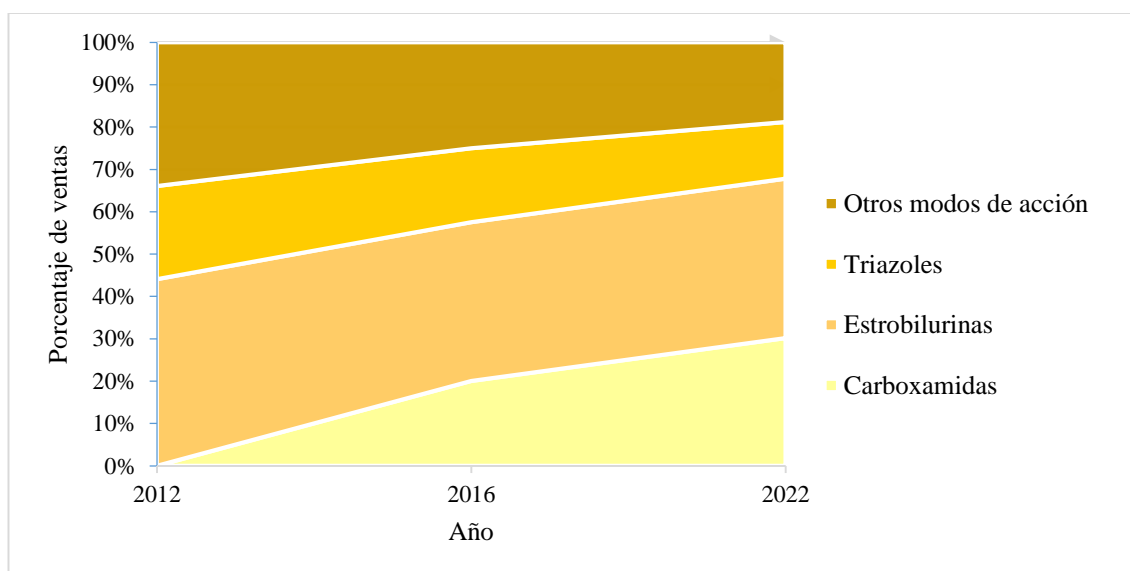
#### **1.5.2.7 Mezcla de carboxamidas más estrobilurinas más triazol**

Si bien las mezclas de estrobilurinas más carboxamidas aumentan la eficiencia de control, sus MoA son similares (complejos enzimáticos de la membrana mitocondrial que participan del transporte de electrones, generando energía). Por lo tanto, es muy importante mezclar estos dos MoA semejantes con un tercero diferente, como por ejemplo los triazoles, disminuyendo o retardando la generación de resistencia por parte

de los patógenos. Además, en esta triple mezcla se combinan el efecto preventivo más el curativo ofrecido por el triazol (Carmona y Sautua, 2016).

La incorporación de carboxamidas en las mezclas dobles de triazol + estrobilurina han mostrado tener un mejor efecto de control y sobre otras manchas foliares en cebada (Carmona y Sautua, 2015).

La tecnología de fungicidas utilizados en la producción de cereales y granos a nivel mundial dominaron el mercado de fungicidas en 2015 y se proyecta que sea el segmento de mayor tasa de crecimiento durante el periodo 2016-2022 (Fig. 1.5), con un importante aumento del uso de carboxamidas a partir del 2012 (Berdugo *et al.*, 2012).



**Figura 1.5** Evolución de ventas de las diferentes tecnologías (principios activos) utilizadas en la protección de cultivos y futuras proyecciones considerando el periodo 2012-2022 a nivel mundial (no se incluyen biofungicidas ni terapicos de semilla) (Extraído de Fleitas, 2017).

## 1.6 Planteo del problema

En Argentina hay una creciente preocupación relacionada con el manejo de los fungicidas y las consecuencias de su mal empleo. Por un lado, existe una necesidad prioritaria de generar conocimiento científico sobre aspectos relacionados con las buenas prácticas de manejo de fungicidas; y por el otro, de determinar y monitorear en

el tiempo la sensibilidad de las diferentes poblaciones de los patógenos a los diferentes principios activos fungicidas actualmente en uso.

En las últimas campañas agrícolas, se han incrementado en el cultivo de cebada la prevalencia, incidencia y severidad de las manchas foliares en comparación con otras enfermedades. Esto obligó a una mayor utilización de fungicidas, generando mayores probabilidades de riesgo de generar resistencia (Carmona y Sautua, 2017). Por su parte, en los cultivos de cebada predominaron las manchas foliares (Mancha en red, Borrosa, Escaldadura y Ramulariosis) cuya aparición temprana requirió de intervenciones anticipadas para su control.

Entre las causas más frecuentes que originan la resistencia se destacan el uso continuo de moléculas con el idéntico mecanismo de acción, la utilización de sub-dosis y/o aplicaciones divididas, los cambios en los intervalos de aplicación, las aplicaciones tardías y fallas en la tecnología de aplicación (Carmona y Sautua, 2017).

En la provincia de Buenos Aires existen dos zonas diferentes en cuanto al uso de fungicidas. La zona sudeste, con mayor superficie de cebada y mayor intensidad de ataque de manchas foliares, y la zona norte con menor superficie e intensidad de manchas. De esta manera, el uso de fungicidas es mayor en la zona sur (tres aplicaciones promedio de fungicida) que en la norte (promedio de dos aplicaciones). Esto sugiere una mayor presión de selección a poblaciones de patógenos en regiones con más aplicaciones, pudiendo dar origen a subpoblaciones que potencialmente pierden la sensibilidad en el transcurso del tiempo a aquellas sustancias químicas.

Uno de los primeros indicios del posible cambio de la sensibilidad a los fungicidas en una población de un determinado patógeno, son las fallas de control de ciertas moléculas detectadas a campo. Si bien estas fallas de control para *B. sorokiniana* aún no han sido investigadas en Argentina, los comentarios y reclamos de falta de eficiencia de control entre los productores y asesores son cada vez más frecuentes.

La resistencia a fungicidas puede detectarse mediante la comparación de la  $CI_{50}$  (Concentración inhibitoria capaz de inhibir el crecimiento micelial en un 50%) de aislados resistentes y sensibles (Georgopoulos, 1982). Edgington *et al.*, (1971) utilizan como criterio para establecer la sensibilidad de un hongo a compuestos químicos el valor de la  $CI_{50}$ .

El monitoreo de la sensibilidad debe realizarse en todas las áreas del cultivo de importancia económica de manera a tener conocimiento sobre la evolución de las poblaciones fúngicas relacionado directamente con la estrategia del control químico. Para lograr esto hay que generar información precisa para fomentar la extensión hacia productores y asesores técnicos, colaborar con las entidades de investigación y entes gubernamentales teniendo como objetivo desarrollar estrategias anti-resistencia.

De acuerdo con la bibliografía nacional e internacional consultada, no existen antecedentes relacionados al estudio de la sensibilidad de *B. sorokiniana* en ningún cultivo hospedante. Por tanto, la presente tesis de maestría es inédita en el mundo, buscando presentar al mismo tiempo el primer informe de fungitoxicidad de las moléculas de mayor uso para el control de las manchas foliares y la sensibilidad a los fungicidas de los aislados de *B. sorokiniana* en la Argentina.

La problemática presentada y la falta de información sobre el tema hacen necesario el estudio de la sensibilidad del patógeno. Por consiguiente, el monitoreo de la sensibilidad a fungicidas, en una población de patógenos, es importante para determinar la presencia de linajes resistentes, de manera de poder mantener la eficiencia del control químico en el tiempo (Carmona y Reis, 2011).

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo general**

El objetivo general de esta tesis fue, por una parte, estudiar el comportamiento de aislados de *B. sorokiniana* en relación a su sensibilidad frente a distintas dosis de fungicidas a nivel *in vitro* y por otra, evaluar el efecto del fungicida más fungitóxico al aislado más y menos sensible a nivel *in vivo*. Estos resultados servirán para futuros monitoreos de la sensibilidad de poblaciones de *B. sorokiniana* a diferentes principios activos de fungicidas, de manera de tener un registro inicial y poder comparar con nuevas poblaciones en el transcurso del tiempo.

### **1.7.2 Objetivos particulares**

- 1) Obtener aislados representativos de *B. sorokiniana* a partir de muestras (semillas, hojas) provenientes de lotes comerciales de cebada del norte y sudeste de la provincia de Bs. As.
- 2) Caracterizar morfológicamente los aislados de *B. sorokiniana* obtenidos.



- 3) Establecer un perfil de sensibilidad de los aislados de *B. sorokiniana* argentinos, a los principios activos (grupos IQE, ISDH, IDM) de los fungicidas mezcla para el cultivo de cebada, mediante la determinación de la  $CI_{50}$  en cada combinación aislado-fungicida.
- 4) Clasificar la fungitoxicidad de los fungicidas mezclas aplicados a los aislados de *B. sorokiniana*, a partir de los valores de la  $CI_{50}$  calculados.
- 5) Evaluar a nivel *in vivo* la sensibilidad de los aislados más y menos sensibles a la aplicación del fungicida que haya resultado con mayor fungitoxicidad en la prueba *in vitro*.

## 1.8 Hipótesis

- 1) Los principios activos fungicidas (IQE, ISDH, IDM) en mezclas comerciales, que frecuentemente se utilizan en el cultivo de cebada en la Argentina, no presentan  $CI_{50}$  *in vitro* significativamente diferente entre sí para cada uno de los diferentes aislados de *B. sorokiniana*.
- 2) La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *B. sorokiniana* no es variable en función de la procedencia geográfica de las cepas.
- 3) La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *B. sorokiniana* es variable en función de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados.
- 4) Es posible clasificar los aislados de *B. sorokiniana* según su diferente sensibilidad a los fungicidas.
- 5) El aislado de menor sensibilidad de *B. sorokiniana* proveniente de la prueba *in vitro* presentará baja sensibilidad al fungicida de mayor fungitoxicidad a nivel *in vivo* y, por ende, el aislado de mayor sensibilidad de *B. sorokiniana* proveniente de la prueba *in vitro* presentará alta sensibilidad al fungicida de mayor fungitoxicidad a nivel *in vivo*.

## **Capítulo II:**

### **Sensibilidad micelial de aislados de *Bipolaris sorokiniana* a fungicidas “*in vitro*”**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Un gran número de hongos tienen la capacidad de adaptarse y volverse menos sensibles a los fungicidas usados para controlarlos (fungicidas a base de mezclas de IDM (inhibidores de la desmetilación), ISDH (inhibidores de la succinato deshidrogenasa) y IQE (inhibidores de la quinona externa).

La determinación de la concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ), es decir, la concentración que controla el 50% de la población del patógeno, es un parámetro de comparación esencial para desarrollar estudios de sensibilidad (Russel, 2004). Esta medida sirve para comparar la potencia fungitóxica entre fungicidas y al mismo tiempo, para determinar si existe variabilidad entre aislados a un mismo grupo de fungicidas (Carmona *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2015).

Edgington *et al.* (1971) propusieron el siguiente criterio para clasificar una sustancia fungicida de acuerdo a su fungitoxicidad: aquellas sustancias que presentan una  $CI_{50}$  menor a 1  $\mu\text{g/mL}$  son altamente fungitóxicas; aquellos compuestos que poseen una  $CI_{50}$  entre 1 y 50  $\mu\text{g/mL}$  son moderadamente fungitóxicos; y, finalmente, las sustancias cuya  $CI_{50}$  es mayor a 50  $\mu\text{g/mL}$  resultan no tóxicas.

Ghini y Kimati (2000) definen el término sensibilidad como lo opuesto a la resistencia, cuando describen que hongos resistentes a fungicidas presentan una reducción en la sensibilidad. La resistencia a fungicidas es definida como una alteración heredable y estable en un hongo en respuesta a una aplicación de un fungicida, resultando en una reducción de la sensibilidad al producto. Los autores también sugieren que el término insensibilidad no debe ser utilizado como sinónimo de resistencia, ya que el término sugiere la completa falta de sensibilidad. El término insensibilidad se propuso para describir hongos para los cuales un fungicida nunca presentó ningún efecto. No todos los hongos son sensibles a todos los fungicidas (espectro de acción), algunos siempre serán insensibles a ciertas moléculas (Reis *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2018).

Según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Comitee, FRAC 2018), el monitoreo de la sensibilidad de un hongo al fungicida es importante para maximizar su eficiencia de control. Por esta razón, es muy importante establecer la sensibilidad para cada combinación fungicida/patógeno (Brent y Hollomon, 1988).

En este capítulo se cumplen los objetivos particulares 1, 2 y 3 detallados a continuación:

a) Caracterizar morfológicamente los aislados de *B. sorokiniana* de semillas de cebada de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires; b) Establecer un perfil de sensibilidad de los aislados de *B. sorokiniana* argentinos, a los principios activos (grupos IQE, ISDH, IDM) de los fungicidas mezcla para el cultivo de cebada, mediante la determinación de la  $CI_{50}$  en cada combinación aislado-fungicida; c) Realizar una clasificación de la potencia de los fungicidas más frecuentemente usados en el cultivo de cebada para los diferentes aislados analizados.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Obtención y caracterización de aislados

A partir de marzo del 2016, muestras de semillas de cebada, así como de hojas con síntomas de mancha borrosa proveniente de las principales zonas productoras del país fueron recepcionadas para su posterior análisis en el laboratorio de la Cátedra de fitopatología de la Facultad de Agronomía (UBA). Las muestras se identificaron según su origen, variedad, campaña agrícola.

Los aislados se obtuvieron de diferentes cultivares de cebada provenientes de dos regiones de la provincia de Buenos Aires (Fig. 2.1). El aislado FB de la campaña 2000 se obtuvo a partir de una colección perteneciente a la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Este aislado representa la población más antigua que se pudo obtener, y por ende la que tuvo menor exposición a fungicidas, presumiéndose más sensible en comparación con los aislados más actuales. En total se obtuvieron 19 aislados puros de *B. sorokiniana*. Para la determinación de la sensibilidad *in vitro* en el presente estudio, se seleccionaron al azar 10 aislados (Tabla 2.1).



Figura 2.1 Puntos de muestreo a partir de los cuales se obtuvieron semillas y/o hojas de cebada infectadas con *B. sorokiniana*.

Para incubar las semillas se utilizó la metodología empleada por Jørgensen (1983). Estas fueron sembradas sobre doble papel filtro (adsorción media) en placas de petri de 90 mm, previamente humedecidas con agua destilada esterilizada (ADE), colocándose de manera equidistante una de otra mediante el uso de una pinza esterilizada. Se sembraron 100 semillas a razón de 25 por placa (Reis *et al.*, 1999), y se estimó el porcentaje de la incidencia de *B. sorokiniana* en las muestras analizadas. Las semillas se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas para inducir la germinación, después de este período, las semillas se congelaron a  $-20 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas para detener la germinación y evitar así una contaminación cruzada dentro de la placa. Finalmente, las semillas se incubaron a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 días con ciclos alternativos de 12 horas de luz cercana a ultravioleta (Tubos 40 W) y 12 horas de oscuridad.

Para las hojas, se realizaron cortes de tejido foliar conteniendo lesiones de aproximadamente 3 x 3 mm, siguiendo el criterio de una parte sana y otra parte lesionada para cada fragmento. Los fragmentos fueron inmersos en alcohol al 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 1% durante 60 segundos y enjuagados dos veces con ADE durante 60 segundos. Se sembraron 5 fragmentos foliares por placa con doble papel filtro previamente humedecido con ADE. Las placas fueron selladas con “parafilm” para evitar la pérdida de humedad y fueron incubados a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  por 5 días con ciclos alternativos de luz cercana a ultravioleta y oscuridad de 12hs/12hs para favorecer la esporulación.

Luego de la incubación, tanto de semillas como de material vegetal enfermo, se procedió a observar y cuantificar (incidencia) bajo microscopio estereoscópico (LEICA, 60x) la presencia de conidios característicos de *B. sorokiniana* (en la superficie de la carióspside en semilla y alrededor de las lesiones foliares). Se consideró como semilla infectada aquella que presentó conidióforos con conidios.

**Tabla 2.1** Aislados de *B. sorokiniana* utilizados para el ensayo de concentración inhibitoria. Se indica para cada aislado: campaña agrícola, localidad, región de origen, la variedad y la incidencia

<b>Aislado</b>	<b>Variedad</b>	<b>Localidad</b>	<b>Año</b>	<b>Incidencia</b>	<b>Región</b>
DB	Skarlett	San Pedro	2008	39	
MO	Sylphide	Bigand	2015	*	
BB	Shakira	Carlos Casares	2014	95	Norte
CB	Shakira	San Pedro	2008	81	
AB	Sylphide	Bigand	2015	67	
FB	Skarlett	Cnel. Suárez	2000	5	
MB	Sylphide	Balcarce	2016	*	
35B	Overture	Azul	2016	9	Sur
16B	Skarlett	Bragado	2008	63	
40B	Andreia	Dorrego	2016	2	

\*Aislado obtenido a partir de hojas infectadas

Los valores de incidencia de *B. sorokiniana* en las muestras de semillas a partir de las cuales se aisló, variaron entre el 39 al 95% en la región norte; mientras que las muestras

provenientes de la región sur presentaron valores más bajos, entre 2 y 63% respectivamente. Los aislados MO y MB fueron obtenidos a partir de material vegetal.

A continuación, se procedió al aislamiento. Con la ayuda de una aguja de 0,4 mm x 1/2" previamente esterilizada, se transfirieron los conidios a placas de petri con medio agar-papa-glucosado (APG, 200 g de papa, 20 g de dextrosa, 20 g de agar, 1000 ml de ADE). Las placas fueron incubadas bajo condiciones anteriormente descritas. Una vez verificado el crecimiento de las colonias, se realizaron repiques sucesivos hasta la obtención de un cultivo puro. Los aislados confirmados fueron preservados en doble copia, bajo tubos de ensayos con medio APG con vaselina, mantenidos a temperatura ambiente, crioviales con agua estéril y refrigerados a 4°C, para garantizar la procedencia del aislado en caso de pérdida o contaminación durante los ensayos.

Después de la incubación se procedió a elegir colonias desarrolladas, con características representativas del hongo. La identificación sobre base morfológica se realizó según lo señalado por Ellis (1971) y Sivanesan (1987). Así también los aislados se diferenciaron en diferentes grupos culturales en función de su color y forma de la colonia siguiendo a Aminuzzaman *et al.* (2010). Para la medición de conidios se delimitaron 5 puntos al azar de cada placa con características representativas de cada aislado, con la ayuda de un ansa, pequeños fragmentos de micelio fueron transferidos a un portaobjetos para montarlo en 0,1 ml de ADE, y poder observar con la ayuda de un microscopio óptico (magnitud 40X), con ocular graduado acoplado. Se midió el ancho, el largo y el número de pseudoseptos de 50 conidios aleatoriamente, para cada aislado, los valores del largo y del ancho fueron multiplicados por un factor de conversión (FC 2,04) establecido para obtener el valor real en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

### **2.2.2 Determinación de la concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>)**

Para la determinación de la sensibilidad micelial de *B. sorokiniana* a fungicidas "*in vitro*" fueron utilizados los diez aislados descritos en el apartado anterior. Uno de los aislados fue considerado como sensible, mientras que los otros nueve fueron considerados como aislados con posible falta de sensibilidad a los fungicidas. El criterio para establecer la hipótesis fue que el aislado sensible provenía de la campaña agrícola 1999/2000, es decir, las poblaciones de *B. sorokiniana* fueron expuestas a un menor número de aplicaciones y tampoco existía hasta la fecha en el mercado mezclas de

fungicidas que son aplicados en la actualidad. El aislado proveniente de la cosecha 1999/2000 fue obtenido a partir de semillas mantenidas a 4 °C en el banco de la cátedra de Fitopatología de la FAUBA, mediante la técnica de aislamiento e incubación anteriormente descrita, se logró aislar al patógeno para ser utilizado en el presente experimento.

Los fungicidas estudiados fueron: azoxistrobina (20%) + cyproconazole (8%); isopirrazam (12.5%) + azoxistrobina (20%); trifloxystrobina (15%) + prothioconazole (17.5%); fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%) y proticonazole (17.5%) + trifloxystrobina (15%) + bixafen (12.5%).

Se utilizaron protocolos (agar modificado) descriptos por Stolte (2006) y Carmona *et al.* (2017). Seis concentraciones de fungicidas fueron utilizadas en los ensayos: 0; 0.01; 0.1; 1; 10 y 20 µg/mL de principio activo de cada fungicida en APG. La concentración 0 µg/mL representó el control del ensayo. Se procedió al armado de dos soluciones madres, una de 10 µg/mL, denominada “solución 1”, para las concentraciones que van de 1 µg/mL a 20 µg/mL y otra de 0.01 µg/mL, denominada “solución 2”, para las concentraciones de 0.01 µg/mL a 0.1 µg/mL. La concentración de principio activo contenida en cada formulación de fungicida utilizado fue obtenida de acuerdo a lo informado por el fabricante.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por una placa de petri. El ensayo se repitió dos veces para cada combinación aislado-fungicida a fin de garantizar la precisión de los resultados. Se procedió a pipetear alícuotas de las soluciones madres para así obtener las distintas concentraciones de cada fungicida, se depositó en medio de cultivo APG derretido y se agitó hasta homogeneizar la mezcla, luego se volcaron en placas de petri y una vez solidificado el medio se procedió a sembrar en el centro un disco micelial de 6 mm obtenido a partir de colonia puras de siete días de edad, en crecimiento activo. Todas las placas fueron incubadas en cámara de crecimiento ambiental Percival model I-36LL (Percival Scientific Inc., Perry, IA), a  $24 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se utilizaron tubos de luz cercana al ultra violeta (320-420 nm, provista por tubos fluorescentes negros 40 Watts) posicionadas a 50 cm de las placas. El crecimiento micelial fue medido con la ayuda de un calibre digital (DIGIMESS, N°. 1304I, China), una vez que el control alcanzó el borde de la placa (7 días de incubación)



La  $CI_{50}$  se calculó siguiendo la metodología reportada por Wong y Wilcox (2001). Para lo cual, el porcentaje del crecimiento relativo (CR) se determinó como (crecimiento radial en la concentración del fungicida / crecimiento radial en la caja sin fungicida) x 100. Para cada fungicida, se usó una regresión lineal log para determinar la relación entre el crecimiento radial y la concentración del fungicida (Carmona *et al.*, 2017). Se usaron valores transformados con logaritmo en base 10 para la variable independiente (concentración de fungicidas), manteniendo la variable dependiente (crecimiento relativo) en su escala original. Se utilizó el programa estadístico R (R Core Team, 2018). La concentración efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial del hongo ( $CI_{50}$ ) para cada aislado fue calculada a partir de la ecuación generada. El ensayo se repitió dos veces para cada combinación aislado-fungicida a fin de garantizar la precisión de los resultados. Las diferencias de  $CI_{50}$  entre aislados y fungicidas fueron analizadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que los datos no provienen de una población con distribución normal de los errores, utilizando el software estadístico InfoStat (2011).

### **2.2.3 Clasificación de la sensibilidad de los aislados de *B. sorokiniana***

Los aislados se clasificaron de acuerdo con Edgington *et al.* (1971), adaptado a los siguientes criterios (Reis y Carmona, 2011): insensibles,  $CI_{50} > 40 \mu\text{g/mL}$ ; baja sensibilidad,  $CI_{50}$  entre 10 y  $40 \mu\text{g/mL}$ ; moderadamente sensible,  $CI_{50}$  entre 1 y  $10 \mu\text{g/mL}$  y altamente sensible,  $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ .

También se obtuvo el factor de reducción de la sensibilidad (FRS). Este parámetro sirve para detectar la magnitud de cambio de un hongo a la sensibilidad de un fungicida. Se calculó dividiendo la  $CI_{50}$  del aislado sospechoso por la  $CI_{50}$  del aislado más sensible (aislado de referencia). Cuando el valor del FRS es igual a 1, no hubo cambio en la sensibilidad y cuanto este valor es  $> 1$ , hubo una reducción de la sensibilidad (Reis y Carmona, 2011).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Descripción morfológica de los aislados

En la Tabla 2.2 se indican las dimensiones conidiales relativas del largo y del ancho medidos para cada aislados, los valores medios para el largo estuvieron entre los 62.5  $\mu\text{m}$  a 90.24  $\mu\text{m}$ , mientras que para el ancho los valores variaron entre 19.82 a 26.52  $\mu\text{m}$  respectivamente. En relación al número de pseudoseptos, la cantidad entre conidios varió de 3 a 10 pseudoseptos respectivamente.

Tabla 2.2 Largo, ancho y número de pseudoseptos de los diferentes aislados de *B. sorokiniana*.

Aislado	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Número de pseudoseptos
DB	32.64 – 83.64 (62.5) b*	14.28 – 21.62 (26.52) b	3 - 8 (5) c
MO	53.04 - 102 (64.70) b	16.32 – 30.6 (21.86) b	3 - 8 (5) c
BB	34.68 – 95.88 (68.95) b	12.24 – 28.56 (19.82) c	3 -9 (6) b
CB	55.08 – 112.2 (79.96) b	16.32 – 26.52 (22.03) b	3 - 8 (5) b
AB	53.04 - 102 (68.12) b	20.4 – 32.64 (25.78) a	4 - 8 (6) b
FB	65.28 – 112.2 (88.69) a	18.36 – 26.52 (22.92) b	4 - 10 (7) a
MB	71.4 – 118.32 (90.24) a	16.32 – 28.56 (22.92) b	4 - 9 (7) a
35B	46.92 – 83.64 (72.37) b	16.32 – 30.6 (22.68) b	4 -8 (6) b
16B	48.96 - 102 (67.80) a	14.28 – 28.56 (22.60) b	3 - 8 (5) c
40B	49.92 – 89.76 (71.97) b	16.32 – 24.48 (20.56) c	4 - 7 (6) b

Límite inferior, superior y media

\*Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Test DGC).

La longitud y el ancho de los conidios de cada aislamiento medidos oscilaron entre los 62.5 a 90.24  $\mu\text{m}$  de largo y 19.82 a 26.52  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 2.2).

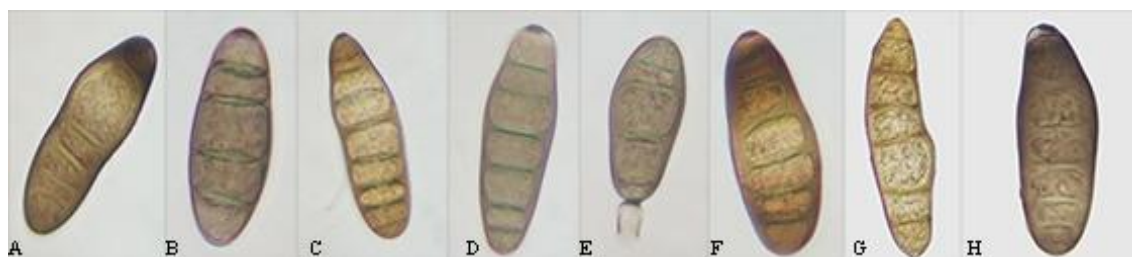
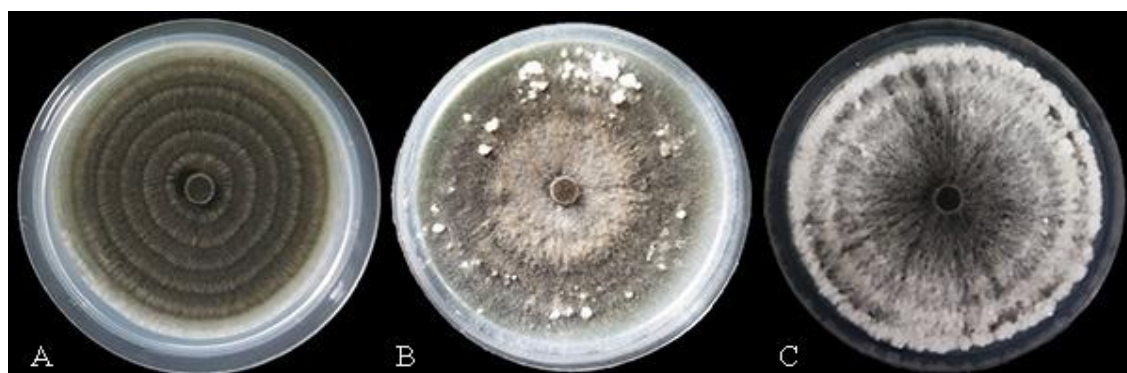


Figura 2.2 Morfología conidial de los diferentes aislados de *B. sorokiniana* (A-H) producidos sobre medio de cultivo APG.

Los 10 aislados de *B. sorokiniana* se dividieron en tres grupos morfológicos sobre la base de la variabilidad micelial y el patrón de crecimiento (Tabla 2.3), de acuerdo con clasificación propuesta por Aminuzzaman *et al.*, (2010). Estos fueron: colonia tipo I, planas, aterciopeladas, totalmente cubiertas de conidios, pardo oliváceo presenta crecimiento radial intercalado, reverso oliváceo oscuro con contornos más claros (Fig. 2.3A); colonia tipo II, la parte central ligeramente algodonosa, gris oliváceo claro, ocasionalmente con micelio de penachos blanquecinos (Fig. 2.3B); colonia tipo III, parte central ligeramente algodonosa, gris oliváceo claro, seguido de una zona aterciopelada oliváceo oscura totalmente cubierta de conidios, formación algodonosa hacia los contornos; con formación de penachos de micelio blanquecinos (Fig. 2.3C).

**Tabla 2.3** Características morfológicas de aislados de *B. sorokiniana* utilizados en el presente estudio.

Grupo	Aislados	Color
I	DB, MO, AB, FB, MB, 16B, BB	Verde oliváceo
II	CB, 40B	Gris / blanco
III	35B	Blanco / verde oliváceo



**Figura 2.3** Diferentes colonias de *B. sorokiniana*. (A) tipo I, (B) tipo II, (C) tipo III.

Colonias del tipo I fueron la más predominante, con un total de 7 aislados, mientras que menos frecuente fueron las colonias del grupo II y III.

### **2.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>) para los diferentes fungicidas**

En la Tabla 2.4 se indica la CI<sub>50</sub> de *B. sorokiniana* para las mezclas de principios activos azoxistrobina + cyproconazole; isopyrazam + azoxistrobina; trifloxystrobina + prothioconazole; fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole y proticonazole + trifloxystrobina + bixafen. En todos los casos, la CI<sub>50</sub> estuvieron por debajo de 1 µg/mL. Según la clasificación de Edgington *et al.* (1971), todos los fungicidas resultaron altamente fungitóxicos siendo por lo tanto todas las cepas altamente sensibles.

Tabla 2.4. Media de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fungicida evaluado para la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *B. sorokiniana*.

Fungicida		$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ promedio ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E.
Azoxistrobina + Cyproconazole	E1**	0.47	0.37 bc*	0.05
	E2	0.28		
Isopyrazam + Azoxistrobina	E1	0.59	0.49 c	0.06
	E2	0.38		
Trifloxystrobina + Prothioconazole	E1	0.20	0.21 b	0.02
	E2	0.23		
Proticonazole + Trifloxystrobina + Bixafen	E1	0.11	0.11 a	0.01
	E2	0.10		
Fluxapyroxad + Piraclostrobina + Epoxiconazole	E1	0.05	0.05 a	0.01
	E2	0.05		

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )

\*\* E1 y E2 = ensayos 1 y 2, respectivamente

El análisis no paramétrico indicó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre sensibilidad a fungicidas, mostrando que los fungicidas doble mezcla, azoxistrobina + cyproconazole, isopyrazam + azoxistrobina y trifloxystrobina + prothioconazole presentaron valores de  $CI_{50}$  más altos en comparación con los fungicidas triple mezcla fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole y proticonazole + trifloxystrobina + bixafen (Fig. 2.4). Sin embargo, la triple mezcla de proticonazole + trifloxystrobina + bixafen no difirió significativamente de la triple mezcla fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole.

El fungicida que mostró un mayor poder inhibitorio micelial fue el fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole ( $0.05 \mu\text{g/mL}$ ), razón por la cual fue seleccionado como el fungicida más fungitóxico para el ensayo *in vivo* (capítulo III).

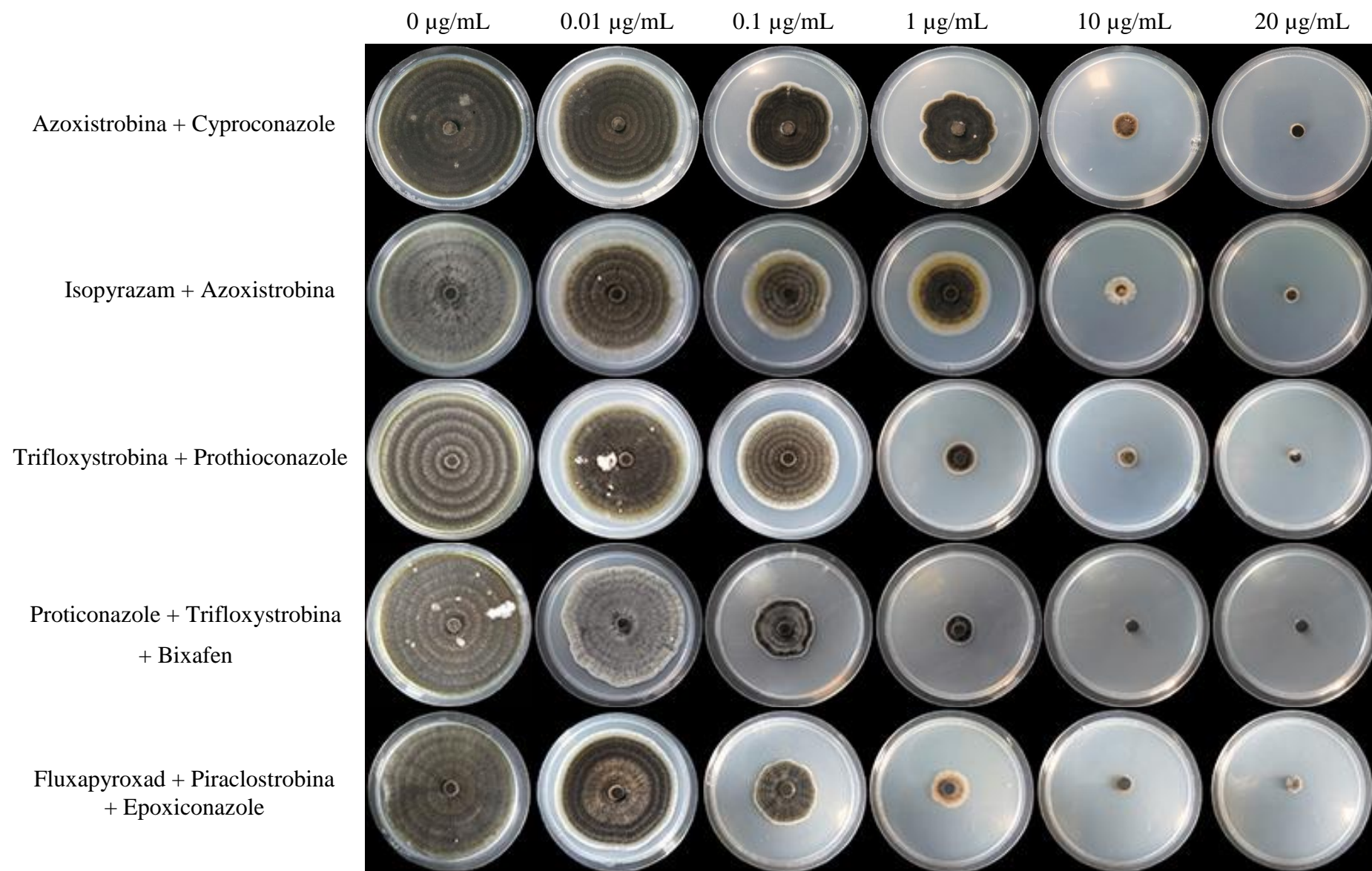


Figura 2.4 Efecto fungitóxico de las diferentes concentraciones de ingredientes activos sobre el crecimiento micelial de *B. sorokiniana* (aislado DB).

### 2.3.3 Clasificación de la sensibilidad de los aislados de *B. sorokiniana*

Según la escala de Edginton *et al.* (1971), todos los aislados de *B. sorokiniana* fueron clasificados como muy sensibles (menor a 1 µg/mL) a las mezclas de fungicidas azoxistrobina (20%) + cyproconazole (8%); isopyrazam (12.5%) + azoxistrobina (20%); trifloxystrobina (15%) + prothioconazole (17.5%); fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%) y proticonazole (17.5%) + trifloxystrobina (15%) + bixafen (12,5%).

Si bien se encontraron diferencias estadísticas en el valor de CI<sub>50</sub> entre aislados para las mezclas trifloxystrobina + prothioconazole, fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole, el análisis no paramétrico demostró que no hubo diferencias estadísticas entre las principales regiones productoras (norte y sur de la provincia de Buenos Aires) para todos los fungicidas testeados (Tabla 2.5). Los valores variaron de 0.18 a 0.44 µg/mL.

Tabla 2.5 Valores medios de CI<sub>50</sub> de diez aislados de *B. sorokiniana* analizado para los cinco fungicidas testeados.

Aislado	Procedencia	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	E.E.
DB	San Pedro	0.44 a	0.16
MO	Bigand	0.31 a	0.11
BB	Bragado	0.20 a	0.07
CB	Dorrego	0.18 a	0.06
AB	Cnel. Suárez	0.21 a	0.08
FB	San Pedro	0.24 a	0.08
MB	Bigand	0.24 a	0.12
35B	Azul	0.20 a	0.08
16B	Balcarce	0.20 a	0.07
40B	Carlos Casares	0.26 a	0.07

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )

### 2.3.4 Sensibilidad de aislados de *B. sorokiniana* a cinco fungicidas

A continuación, se detalla los valores de CI<sub>50</sub> para cada fungicida ponderando por cada uno de los aislados evaluados.

### 2.3.4.1 Sensibilidad de aislados de *B. sorokiniana* a azoxistrobina + cyproconazole

En el caso de azoxistrobina + cyproconazole, los valores de  $CI_{50}$  calculados de la prueba *in vitro* (Tabla 2.6) no se diferenciaron significativamente ( $P > 0.05$ ) entre los distintos aislados. El rango de  $CI_{50}$  varió entre 0.176 a 0.613  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 2.6** Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) de *B. sorokiniana* para el fungicida azoxistrobina + cyproconazole.

Aislados		Ecuación	$R^2$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E
DB	Ensayo 1	$y = -0.107\ln(x) + 0.4827$	91	0.851	0.551 a*	0.30
	Ensayo 2	$y = -0.054\ln(x) + 0.4254$	77	0.251		
MO	Ensayo 1	$y = -0.114\ln(x) + 0.4566$	91	0.683	0.613 a	0.07
	Ensayo 2	$y = -0.119\ln(x) + 0.4272$	97	0.542		
BB	Ensayo 1	$y = -0.099\ln(x) + 0.404$	91	0.379	0.233 a	0.15
	Ensayo 2	$y = -0.076\ln(x) + 0.3151$	97	0.088		
CB	Ensayo 1	$y = -0.111\ln(x) + 0.3709$	96	0.313	0.309 a	0.004
	Ensayo 2	$y = -0.099\ln(x) + 0.3828$	94	0.306		
AB	Ensayo 1	$y = -0.113\ln(x) + 0.3894$	96	0.376	0.479 a	0.10
	Ensayo 2	$y = -0.122\ln(x) + 0.4339$	93	0.582		
FB	Ensayo 1	$y = -0.124\ln(x) + 0.4398$	93	0.615	0.453 a	0.16
	Ensayo 2	$y = -0.083\ln(x) + 0.3974$	81	0.291		
MB	Ensayo 1	$y = -0.115\ln(x) + 0.3942$	94	0.399	0.203 a	0.20
	Ensayo 2	$y = -0.038\ln(x) + 0.3178$	89	0.008		
35B	Ensayo 1	$y = -0.103\ln(x) + 0.3329$	98	0.197	0.176 a	0.02
	Ensayo 2	$y = -0.101\ln(x) + 0.3111$	99	0.154		
16B	Ensayo 1	$y = -0.111\ln(x) + 0.3834$	98	0.350	0.274 a	0.08
	Ensayo 2	$y = -0.059\ln(x) + 0.4044$	78	0.198		
40B	Ensayo 1	$y = -0.115\ln(x) + 0.4212$	97	0.504	0.431 a	0.07
	Ensayo 2	$y = -0.112\ln(x) + 0.3848$	98	0.358		

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )



### 2.3.4.2 Sensibilidad de aislados de *B. sorokiniana* a isopirazam + azoxistrobina

Los valores de  $CI_{50}$  para isopirazam + azoxistrobina que se determinó en este estudio variaron de 0.270 a 0.998  $\mu\text{g/mL}$ , no se encontró diferencias estadísticas entre los distintos aislados (Tabla 2.7). Todos los aislados fueron considerados como muy sensibles según la escala Edgington *et al.* (1971).

**Tabla 2.7** Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) de *B. sorokiniana* para el fungicida isopirazam + azoxistrobina.

Aislados		Ecuación	$R^2$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E.
DB	Ensayo 1	$y = -0.115\ln(x) + 0.5312$	97	1.312	0.998 a*	0.31
	Ensayo 2	$y = -0.104\ln(x) + 0.4604$	98	0.683		
MO	Ensayo 1	$y = -0.122\ln(x) + 0.459$	93	0.715	0.522 a	0.19
	Ensayo 2	$y = -0.11\ln(x) + 0.3778$	98	0.329		
BB	Ensayo 1	$y = -0.132\ln(x) + 0.4036$	94	0.482	0.427 a	0.06
	Ensayo 2	$y = -0.129\ln(x) + 0.3725$	98	0.372		
CB	Ensayo 1	$y = -0.096\ln(x) + 0.372$	92	0.264	0.322 a	0.06
	Ensayo 2	$y = -0.098\ln(x) + 0.4054$	92	0.381		
AB	Ensayo 1	$y = -0.107\ln(x) + 0.3965$	96	0.380	0.270 a	0.11
	Ensayo 2	$y = -0.097\ln(x) + 0.3226$	98	0.161		
FB	Ensayo 1	$y = -0.108\ln(x) + 0.4207$	95	0.480	0.420 a	0.06
	Ensayo 2	$y = -0.122\ln(x) + 0.3755$	96	0.360		
MB	Ensayo 1	$y = -0.127\ln(x) + 0.4788$	97	0.846	0.684 a	0.16
	Ensayo 2	$y = -0.131\ln(x) + 0.4149$	99	0.522		
35B	Ensayo 1	$y = -0.127\ln(x) + 0.4287$	96	0.570	0.450 a	0.12
	Ensayo 2	$y = -0.126\ln(x) + 0.3603$	99	0.330		
16B	Ensayo 1	$y = -0.128\ln(x) + 0.3923$	98	0.431	0.397 a	0.03
	Ensayo 2	$y = -0.12\ln(x) + 0.3785$	99	0.363		
40B	Ensayo 1	$y = -0.122\ln(x) + 0.4018$	95	0.447	0.368 a	0.08
	Ensayo 2	$y = -0.115\ln(x) + 0.3569$	99	0.288		

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )

### 2.3.4.3 Sensibilidad de aislados de *B. sorokiniana* a trifloxystrobina + prothioconazole

Los valores de  $CI_{50}$  de la mezcla entre Trifloxystrobina + prothioconazole variaron 0.155 a 0.324  $\mu\text{g/mL}$ , también se verificaron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre los 10 aislados (Tabla 2.8).

**Tabla 2.8** Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) de *B. sorokiniana* para el fungicida trifloxystrobina + prothioconazole.

Aislados	Ecuación	$R^2$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E.
DB	Ensayo 1 $y = -0.141\ln(x) + 0.3383$	0.95	0.318	0.324 c*	0.01
	Ensayo 2 $y = -0.138\ln(x) + 0.347$	0.94	0.330		
MO	Ensayo 1 $y = -0.128\ln(x) + 0.3139$	0.96	0.234	0.231 abc	0.003
	Ensayo 2 $y = -0.126\ln(x) + 0.3139$	0.94	0.228		
BB	Ensayo 1 $y = -0.123\ln(x) + 0.2641$	0.91	0.147	0.174 abc	0.03
	Ensayo 2 $y = -0.118\ln(x) + 0.3108$	0.97	0.201		
CB	Ensayo 1 $y = -0.11\ln(x) + 0.2546$	0.95	0.107	0.118 a	0.01
	Ensayo 2 $y = -0.105\ln(x) + 0.2847$	0.98	0.129		
AB	Ensayo 1 $y = -0.115\ln(x) + 0.2851$	0.97	0.154	0.155 ab	0.0005
	Ensayo 2 $y = -0.113\ln(x) + 0.2895$	0.96	0.155		
FB	Ensayo 1 $y = -0.119\ln(x) + 0.2738$	0.93	0.149	0.147 a	0.002
	Ensayo 2 $y = -0.109\ln(x) + 0.2885$	0.97	0.144		
MB	Ensayo 1 $y = -0.122\ln(x) + 0.2806$	0.92	0.166	0.181 abc	0.02
	Ensayo 2 $y = -0.121\ln(x) + 0.3035$	0.97	0.197		
35B	Ensayo 1 $y = -0.142\ln(x) + 0.3065$	0.88	0.256	0.288 b	0.03
	Ensayo 2 $y = -0.138\ln(x) + 0.3424$	0.94	0.319		
16B	Ensayo 1 $y = -0.126\ln(x) + 0.2842$	0.92	0.180	0.208 abc	0.03
	Ensayo 2 $y = -0.12\ln(x) + 0.3264$	0.98	0.235		
40B	Ensayo 1 $y = -0.134\ln(x) + 0.3183$	0.96	0.258	0.288 b	0.03
	Ensayo 2 $y = -0.129\ln(x) + 0.3527$	0.98	0.319		

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )

#### 2.3.4.4 Sensibilidad de aislados de *B. sorokiniana* a fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole

Para los principios activos fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole se reportaron los valores de  $CI_{50}$  más bajos en comparación a los demás fungicidas, con un rango de 0.002 a 0.118  $\mu\text{g/mL}$ . Hubo diferencia estadística entre los aislados ( $P < 0.05$ ) (Tabla 2.9).

Tabla 2.9 Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) *B. sorokiniana* para el fungicida Fluxapyroxad + Piraclostrobina + Epoxiconazole.

Aislados		Ecuación	$R^2$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E.
DB	Ensayo 1	$y = -0.117\ln(x) + 0.2559$	0.91	0.124	0.118 c*	0.007
	Ensayo 2	$y = -0.114\ln(x) + 0.2494$	0.92	0.111		
MO	Ensayo 1	$y = -0.103\ln(x) + 0.2335$	0.92	0.075	0.087 bc	0.012
	Ensayo 2	$y = -0.107\ln(x) + 0.2515$	0.96	0.098		
BB	Ensayo 1	$y = -0.083\ln(x) + 0.1892$	0.95	0.024	0.014 ab	0.010
	Ensayo 2	$y = -0.065\ln(x) + 0.149$	0.91	0.005		
CB	Ensayo 1	$y = -0.101\ln(x) + 0.2126$	0.89	0.058	0.043 abc	0.015
	Ensayo 2	$y = -0.085\ln(x) + 0.1973$	0.95	0.028		
AB	Ensayo 1	$y = -0.104\ln(x) + 0.2441$	0.94	0.085	0.058 abc	0.027
	Ensayo 2	$y = -0.083\ln(x) + 0.211$	0.98	0.031		
FB	Ensayo 1	$y = -0.09\ln(x) + 0.2052$	0.93	0.038	0.073 bc	0.035
	Ensayo 2	$y = -0.106\ln(x) + 0.2634$	0.984	0.107		
MB	Ensayo 1	$y = -0.076\ln(x) + 0.1815$	0.92	0.015	0.017 ab	0.002
	Ensayo 2	$y = -0.079\ln(x) + 0.1876$	0.96	0.019		
35B	Ensayo 1	$y = -0.06\ln(x) + 0.1499$	0.97	0.003	0.002 a	0.001
	Ensayo 2	$y = -0.056\ln(x) + 0.1297$	0.91	0.001		
16B	Ensayo 1	$y = -0.076\ln(x) + 0.1611$	0.89	0.012	0.010 ab	0.002
	Ensayo 2	$y = -0.073\ln(x) + 0.1489$	0.86	0.008		
40B	Ensayo 1	$y = -0.11\ln(x) + 0.2381$	0.91	0.092	0.095 bc	0.003
	Ensayo 2	$y = -0.107\ln(x) + 0.2506$	0.95	0.097		

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )

### 2.3.4.5 Sensibilidad de aislados de *B. sorokiniana* a proticonazole + trifloxystrobina + bixafen

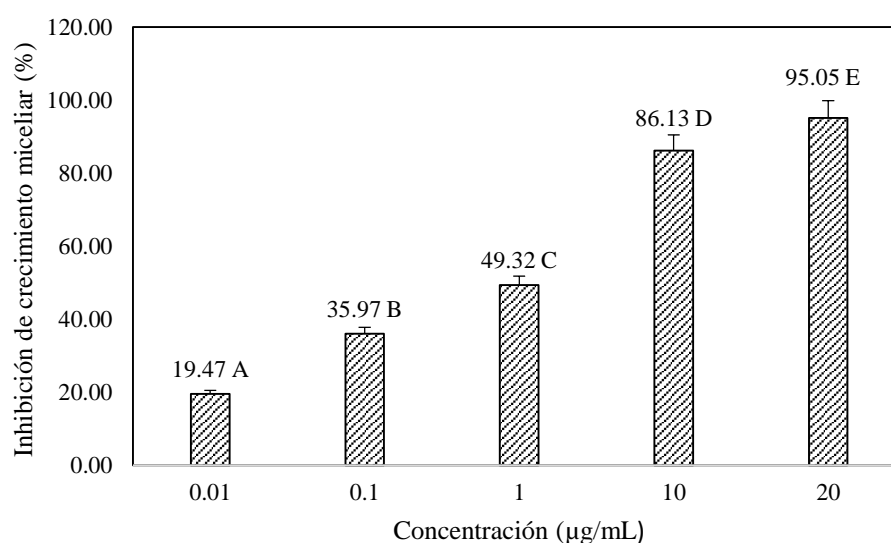
No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre aislados (Tabla 2.10). El rango de  $CI_{50}$  para proticonazole + trifloxystrobina + bixafen se ubicó entre 0.100 a 0.205  $\mu\text{g/mL}$  con una media de 0.11  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 2.10** Aislados, ecuación, coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ) *B. sorokiniana* para el fungicida Proticonazole + Trifloxystrobina + Bixafen.

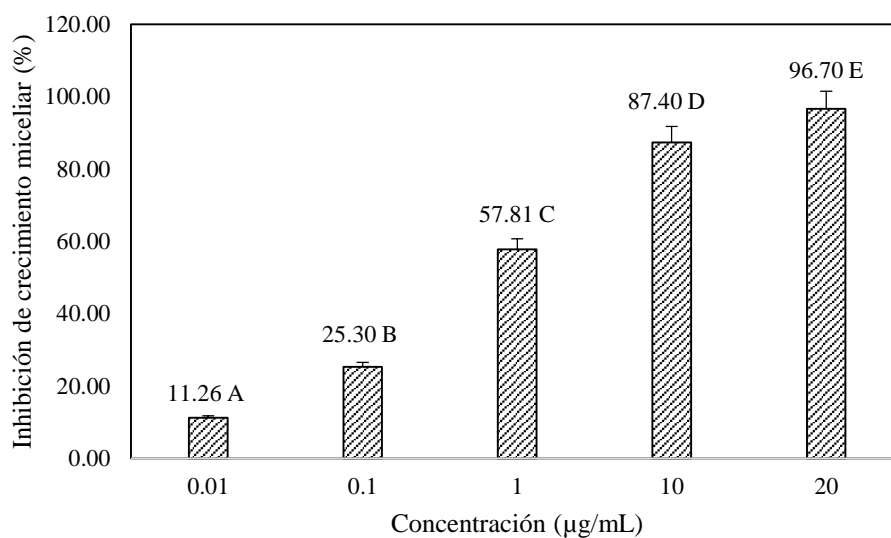
Aislados	Ecuación	$R^2$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E.
DB	Ensayo 1 $y = -0.125\ln(x) + 0.3003$	0.91	0.202	0.205 a*	0.003
	Ensayo 2 $y = -0.126\ln(x) + 0.3024$	0.91	0.208		
MO	Ensayo 1 $y = -0.117\ln(x) + 0.2658$	0.94	0.135	0.109 a	0.027
	Ensayo 2 $y = -0.101\ln(x) + 0.2477$	0.97	0.082		
BB	Ensayo 1 $y = -0.099\ln(x) + 0.2039$	0.89	0.050	0.071 a	0.022
	Ensayo 2 $y = -0.107\ln(x) + 0.2454$	0.93	0.093		
CB	Ensayo 1 $y = -0.096\ln(x) + 0.2053$	0.91	0.046	0.089 a	0.043
	Ensayo 2 $y = -0.113\ln(x) + 0.2711$	0.96	0.132		
AB	Ensayo 1 $y = -0.099\ln(x) + 0.214$	0.91	0.056	0.063 a	0.008
	Ensayo 2 $y = -0.099\ln(x) + 0.2381$	0.97	0.071		
FB	Ensayo 1 $y = -0.116\ln(x) + 0.2551$	0.91	0.121	0.125 a	0.005
	Ensayo 2 $y = -0.117\ln(x) + 0.2611$	0.92	0.130		
MB	Ensayo 1 $y = -0.119\ln(x) + 0.2805$	0.95	0.158	0.117 a	0.042
	Ensayo 2 $y = -0.101\ln(x) + 0.2384$	0.96	0.075		
35B	Ensayo 1 $y = -0.105\ln(x) + 0.2229$	0.91	0.071	0.083 a	0.012
	Ensayo 2 $y = -0.106\ln(x) + 0.2504$	0.95	0.095		
16B	Ensayo 1 $y = -0.117\ln(x) + 0.2664$	0.94	0.136	0.116 a	0.02
	Ensayo 2 $y = -0.106\ln(x) + 0.2512$	0.95	0.096		
40B	Ensayo 1 $y = -0.117\ln(x) + 0.2719$	0.95	0.142	0.100 a	0.043
	Ensayo 2 $y = -0.095\ln(x) + 0.2273$	0.96	0.057		

\* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Test de Kruskal Wallis) ( $P > 0.05$ )

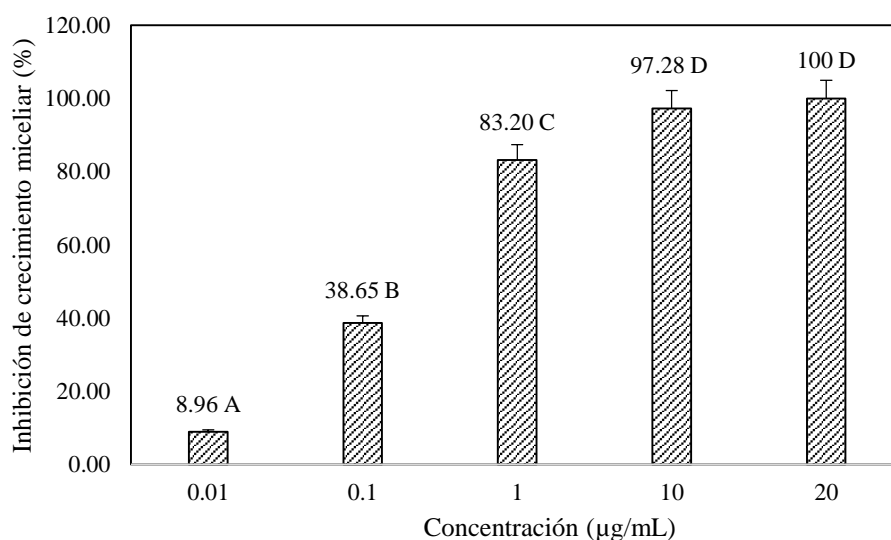
Para los fungicidas azoxistrobina + cyproconazole y isopyrazam + azoxistrobina (Fig. 2.5; 2.6), ninguna concentración inhibió el 100% del crecimiento micelial de los aislados; para trifloxystrobina + prothioconazole solo la concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$  inhibió el 100% del crecimiento micelial de todos los aislados (Fig. 2.7), y para las triple mezcla fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole y prothioconazole + trifloxystrobina + bixafen no se registró crecimiento micelial en las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Fig. 2.8; 2.9)



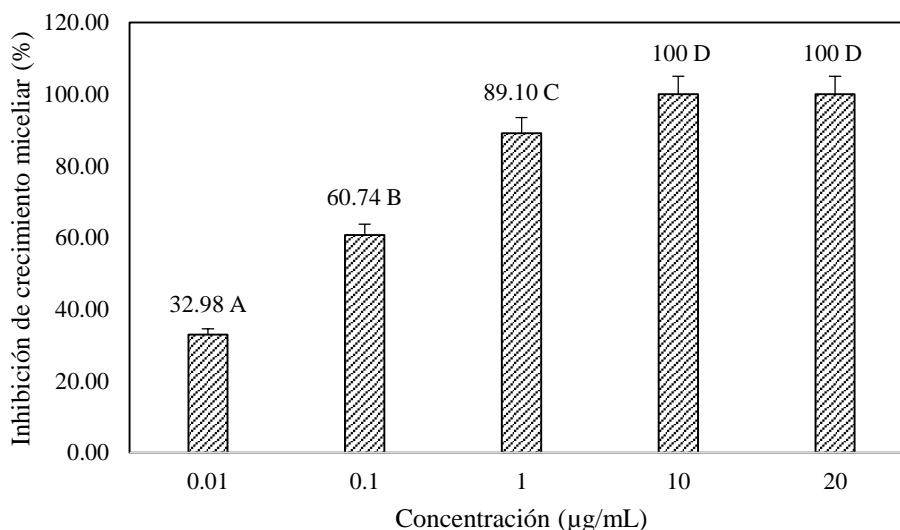
**Figura 2.5** Promedio de inhibición *in vitro* del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de *B. sorokiniana*, expuestos a cinco concentraciones de azoxistrobina (20%) + cyproconazole (8%). Las barras indican los errores estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Test DGC).



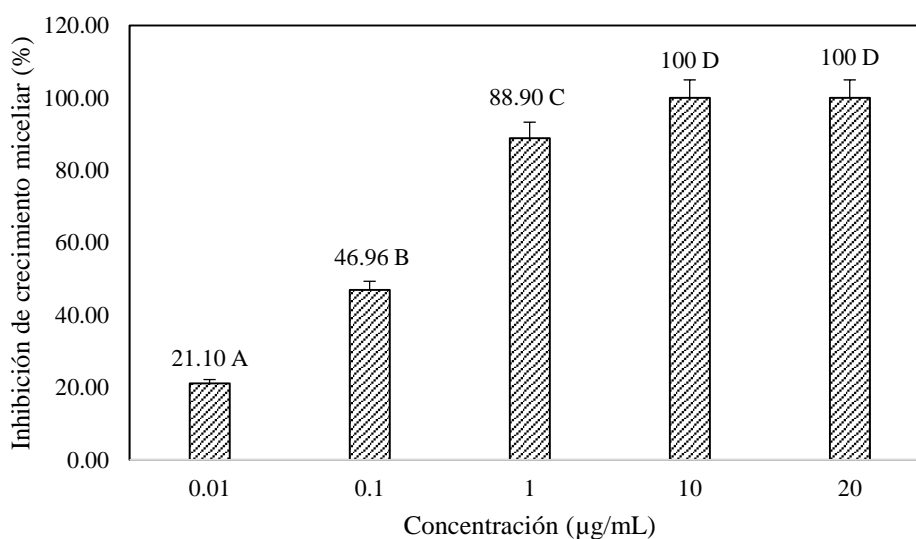
**Figura 2.6** Promedio de inhibición *in vitro* del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de *B. sorokiniana*, expuestos a cinco concentraciones de isopyrazam (12.5%) + azoxistrobina (20%). Las barras indican los errores estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Test DGC).



**Figura 2.7** Promedio de inhibición *in vitro* del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de *B. sorokiniana*, expuestos a cinco concentraciones de trifloxystrobina (15%) + prothioconazole (17.5%). Las barras indican los errores estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Test DGC).



**Figura 2.8** Promedio de inhibición *in vitro* del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de *B. sorokiniana*, expuestos a cinco concentraciones de fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%). Las barras indican los errores estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Test DGC).



**Figura 2.9** Promedio de inhibición *in vitro* del crecimiento de micelios (%) de diez aislados de *B. sorokiniana*, expuestos a cinco concentraciones de prothioconazole (17.5%) + Trifloxystrobina (15%) + bixafen (12.5%). Las barras indican los errores estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Test DGC).

### 2.3.5 Determinación del factor de reducción de la sensibilidad (FRS)

Si bien no hubo diferencias estadísticas significativas entre los valores promedios de  $CI_{50}$  de los 10 aislados (Tabla 2.5), se optó por elegir como línea de base (concentración

de referencia) al aislado FB. Este aislado fue seleccionado hipotéticamente como el linaje sensible por ser de la campaña 2000/01, período en el cual la cantidad de aplicaciones eran menos frecuentes y no se contaban con ciertas mezclas de moléculas en el mercado.

Los valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para el aislado FB establecidas como línea base para las mezclas fueron los siguientes: azoxistrobina (20%) + cyproconazole (8%) = 0.453; isopyrazam (12.5%) + azoxistrobina (20%) = 0.420; trifloxystrobina (15%) + prothioconazole (17.5%) = 0.147; fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%) = 0.073 y prothioconazole (17.5%) + trifloxystrobina (15%) + bixafen (12.5%) = 0.125 (Tablas 2.6 a 2.9).

En el presente estudio no se detectó una pérdida de sensibilidad, pero si se confirmó una reducción de sensibilidad en los aislados que obtuvieron un valor de FRS mayor a 1 para cada fungicida (Tabla 2.11). Esto no representaría una pérdida de sensibilidad, pero marcaría un indicio de que dichos aislados podrían haber reducido su sensibilidad respecto a los otros y serían potenciales candidatos a perder sensibilidad a esos fungicidas en el futuro. Entre todos los aislados de *B. sorokiniana* el que tuvo un mayor valor promedio de FRS fue el DB (1.80).



Tabla 2.11 Factor de reducción de la sensibilidad (FRS) de aislados de *B. sorokiniana*, para las mezclas de ingredientes activos.

Fungicidas	Aislados									Media	E. E.
	DB	MO	BB	CB	AB	MB	35B	16B	40B		
<b>Azoxistrobina 20% + Cyproconazole 8%</b>	1.2	1.4	0.5	0.7	1.1	0.4	0.4	0.6	1	0.81 a	0.37
<b>Isopyrazam 12.5% + Azoxistrobina 20%</b>	2.4	1.2	1	0.8	0.6	1.6	1.1	0.9	0.9	1.17 ab	0.54
<b>Trifloxystrobina 15% + Prothioconazole 17.5%</b>	2.2	1.6	1.2	0.8	1.1	1.2	2	1.4	2	1.50 b	0.48
<b>Fluxapyroxad 5% + Piraclostrobina 8.1% + Epoxiconazole 5%</b>	1.6	1.2	0.2	0.6	0.8	0.2	0.03	0.1	1.3	0.67 a	0.58
<b>Prothioconazole 17.5% + Trifloxystrobina 15% + Bixafen 12.5%</b>	1.6	0.9	0.6	0.7	0.5	0.9	0.7	0.9	0.8	0.84 a	0.31
Media	1.80 b	1.26 ab	0.7 a	0.72 a	0.82 a	0.86 a	0.85 a	0.78 a	1.20 ab		
E. E	0.49	0.26	0.40	0.08	0.27	0.57	0.75	0.45	0.48		

## 2.4 DISCUSIÓN

Los aislados de *B. sorokiniana* variaron estadísticamente (Tabla 2.2) en cuanto a la morfología conidial y forma de la colonia (Tabla 2.3). Las diferencias morfológicas probablemente estén influenciadas por diferentes genotipos de hospedantes y condiciones climáticas (Kumar *et al.*, 2011). El hongo fitopatógeno *B. sorokiniana* tiene una alta variabilidad morfológica (Chand *et al.*, 2003; Maraite *et al.*, 1998; Mishra, 1981; Nelson, 1960; Jaiswal *et al.*, 2007; Ghazvini y Tekauz, 2007), que hasta ahora no se ha confirmado a nivel molecular (Nelson, 1960; Oliveira *et al.*, 1998), aunque esta variabilidad parece ser mayor con el transcurso del tiempo (Hetzler *et al.*, 1991; Jeger, 2004). Sin embargo, recientemente se han identificado los genes de virulencia ToxA y ToxB (McDonald *et al.*, 2018) y genes de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs y MAPKKK) (Leng y Zhong, 2015) asociados con la patogenicidad y la virulencia de este patógeno en plantas de cebada. Asimismo, se están realizando esfuerzos para encontrar resistencia duradera en cultivares de cebada contra este patógeno (Roy *et al.*, 2010; Bovill *et al.*, 2010).

Jaiswall *et al.* (2007) encontraron una correlación entre la virulencia y la morfología colonial, en la que los aislados con micelio oscuro eran más virulentos. Del mismo modo, Pandey *et al.* (2007) estudiaron la variabilidad de *B. sorokiniana* y pudieron correlacionar la variabilidad morfológica con la virulencia. Independientemente del hecho que *B. sorokiniana* tenga una reproducción predominantemente asexual y haploide, la variabilidad en la morfología sugiere que se produce un amplio intercambio genético en esta especie. Esto puede explicarse por la presencia de núcleos en el micelio y conidios, la variación puede generarse cuando al intercambio de núcleos le sigue la fusión nuclear, la recombinación somática y la redistribución cromosómica para la haploidización (Farías *et al.*, 2005).

De acuerdo con la información provista en la Tabla 2.3, los aislados se pudieron agrupar en 3 grupos morfológicos. Alam *et al.* (1997) también identificó 7 divergencias morfológicas entre 27 aislados de *B. sorokiniana*. Ahmed *et al.* (1997) clasificaron 27 aislados en 4 grupos distintos. Debnath (1997) clasificó los aislados recogidos en 2 grupos, cromogénicos (productores de pigmentos) y no cromogénicos. Maraite *et al.* (1998) estudiaron 27 aislados de *B. sorokiniana* y encontraron diferentes colores de colonia que variaron de blanco a rosa claro llegando hasta el verde oscuro. Adhikary,

(2000) estudió la variabilidad entre 122 aislados monoconidiales de *B. sorokiniana* recolectados de las principales áreas productoras de trigo en Bangladesh y clasificó los aislamientos en 4 grupos morfológicos. Ahmed (2001) recolectó 262 aislados de *B. sorokiniana* de 16 áreas principales de cultivo de trigo de Bangladesh y agrupó estos aislamientos en 13 grupos fisiológicos en función de sus características culturales. Pandey *et al.* (2005) agruparon los aislados en 5 grupos morfológicos diferentes y probaron la virulencia de los aislamientos en los diferentes grupos. Iftikhar *et al.* (2009) agruparon en 4 clases morfológicas que contenían colonias de color negro, gris negruzco, marrón y albino (blanquecino). Srinivas *et al.* (2009) clasificaron 103 aislados en cinco grupos en función de sus caracteres morfológicos recogidos en diferentes zonas geográficas de la India. Aminuzzaman *et al.* (2010) clasificaron 86 aislados en 9 grupos culturales basados en la morfología de la colonia y el color de la colonia.

En el presente trabajo todos los aislados produjeron conidios de forma recta en medio APG. Shoemaker (1959) propuso que los conidios de *B. sorokiniana* eran fusoides, rectos o curvos. Barnett y Hunter (1998) informaron que los conidios de *B. sorokiniana* eran rectos o curvos. Mathur y Kongsdal (2000) informaron que la mayoría de los conidios eran rectos o ligeramente curvados. Aminuzzaman y Hossain (2005) informaron en un ensayo que el número máximo de conidios eran rectos, mientras que pocos eran ligeramente curvados. Iftikhar *et al.* (2009) encontraron que los conidios eran cilíndricos, rectos y ligeramente curvados. Aminuzzaman *et al.* (2010) reportaron que la mayoría de los conidios de aislados de *B. sorokiniana* eran rectos. Acharya *et al.* (2011) reportaron que los conidios eran rectos, ligeramente curvado, oblongo, fusiforme a ampliamente elipsoidal, marrón oliva a marrón oscuro, cónico hacia el final y tiene una cicatriz basal prominente. Kumar *et al.* (2002) describieron a los conidios como elípticos de pared gruesa y con septos transversales.

Con el análisis de la tabla 2.2 se demostró que hubo diferencia morfológica entre los diez aislados, tanto los valores del largo y ancho conidial como también el número de pseudoseptos coinciden con lo reportado por otros autores. Shoemaker (1959) informó que la longitud y el ancho de los conidios de *B. sorokiniana* eran 60 – 120  $\mu\text{m}$  x 12 – 20  $\mu\text{m}$ . Ahmed *et al.* (1997) informaron que la longitud y el ancho de conidios variaban de 37 – 270  $\mu\text{m}$  a 15 – 65  $\mu\text{m}$ . Mathur y Kongsdal (2000) informaron que los conidios

tenían una longitud de 40 – 120  $\mu\text{m}$  y una anchura de 17 – 28  $\mu\text{m}$ . Aminuzzaman y Hossain (2005) reportaron que la longitud y el ancho de los conidios variaron de 28.12 a 75.69  $\mu\text{m}$  y 10.64 a 15.04  $\mu\text{m}$  respectivamente. Barba *et al.* (2004) informaron que la longitud y el ancho de los conidios en medio de cultivo APG fue de 29 a 100 (media de 65.3)  $\mu\text{m}$  a 15 – 28 (media de 22.8)  $\mu\text{m}$  respectivamente. Iftikhar *et al.* (2009) encontraron que los tamaños conidiales oscilaban entre 38.3 – 65.8  $\mu\text{m}$  x 12.3 – 25  $\mu\text{m}$ . Aminuzzaman *et al.* (2010) informaron que la longitud máxima de los conidios fue de 75.86  $\mu\text{m}$  y la más baja fue de 33.40  $\mu\text{m}$  y el rango de amplitud fue de 10.52 a 22.86  $\mu\text{m}$ . Acharya *et al.* (2011) reportaron las dimensiones conidiales de *B. sorokiniana* 15-28  $\times$  40 - 120  $\mu\text{m}$ . Kumar *et al.* (2002) informaron que los conidios median 60 - 120  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  12-20  $\mu\text{m}$  de ancho.

Entre los 10 aislados de este ensayo, la septación de conidios varió estadísticamente de 3 a 10. Shoemaker (1959) informó que las células de *B. sorokiniana* conidiales variaban de 5 a 9 septos. Ahmed *et al.* (1997) informaron que en un total de 27 aislados el número de células por conidio variaba entre 3 a 10 septos. Aminuzzaman y Hossain (2005) informaron que el número de tabicaciones variaban de 2 a 8 septos. Iftikhar *et al.* (2009) encontraron 2 a 13 tabicaciones en sus aislamientos. Aminuzzaman *et al.* (2010) informaron que entre 86 aislamientos la septación de conidios vario de 2 a 10 septos. Barba *et al.* (2004) informa que el número de septos fue de 1 a 8 para *B. sorokiniana*. Acharya *et al.* (2011) informaron que los conidios eran de paredes lisas y tenían de 3 a 10 septos transversales de paredes gruesas. Kumar *et al.* (2002) informaron que la cantidad de septos por conidios fue de 5 a 9 células.

Según Barba *et al.* (2004) el ancho, largo y número de pseudoseptos, además de otras características no medibles (color y forma) de los conidios de *B. sorokiniana*, son afectados por diferentes sustratos como, por ejemplo, medio APG, medio de jugo V8, medios a base de extractos de hojas entre otros.

Los resultados de las concentraciones inhibitorias *in vitro* observadas para los distintos fungicidas testeados fueron diferentes entre sí.

Lo esperado en los resultados de la tabla 2.5, era que el aislado FB presente menor valor de  $\text{CI}_{50}$ , ya que es un aislado procedente de la campaña 2000, si bien no hubo diferencia estadística en los valores, hubo otros aislados con menor  $\text{CI}_{50}$ . Dentro de una población

de un mismo patógeno no necesariamente el individuo más antiguo debería ser el más sensible a algún fungicida que un aislado actual. Los aislados de hongos que son sensibles a un fungicida, a menudo son también sensibles a otros fungicidas relacionados, aun cuando no han sido expuestos a estos fungicidas.

Los fungicidas triple mezcla que contenían en su composición química ingredientes activos del grupo de las carboxamidas (ISDH), fluxapyroxad y bixafen respectivamente, a diferencia de los fungicidas doble mezcla (triazoles mas estrobilurinas), fueron los que evidenciaron un mayor poder de inhibición micelial en los 10 aislados. Estos resultados eran los esperados ya que los ISDH aún no han sido utilizados con gran intensidad en la agricultura argentina, y por consiguiente las poblaciones de *B. sorokiniana* y los aislados utilizados en el presente estudio no fueron expuestos a tales moléculas. Aba-Fuentes *et al.* (2015) señalan que los ISDH son altamente efectivas contra patógenos que afectan cereales.

Para Carmona y Sautua (2015), la incorporación de carboxamidas en las mezclas con estrobilurinas o en triple mezcla con triazoles y carboxamidas han mostrado mejor efecto de control sobre las manchas foliares de la cebada con especial énfasis sobre la Ramulariosis.

Stolte (2006), en un ensayo con dos aislados de *B. sorokiniana*, determinó la  $CI_{50}$  para los fungicidas azoxistrobina, cyproconazole, epoxiconazole entre otros ingredientes activos, encontrando valores de 1.09; 0.92 y 0.14  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Si bien estos valores fueron obtenidos a partir de ingredientes activos por separado y en una población del patógeno no representativa, coinciden con los resultados obtenidos en esta tesis para las dobles mezclas que contienen estos mismos ingredientes activos en su composición química. Puesto que no existen otros trabajos de  $CI_{50}$  de referencia para la especie *sorokiniana*, resulta imposible evaluar si hubo o no un cambio en la sensibilidad frente a los fungicidas utilizados, a lo largo del tiempo.

Valores de  $CI_{50}$  fueron informados para otra especie del género *Bipolaris*. Zhang *et al.*, 2011, evaluaron la sensibilidad micelial de 9 cepas de *B. maydis* a 5 fungicidas. Los resultados mostraron que los aislamientos eran sensibles a chlorothalonil, diniconazol y procymidone, cuyos valores de  $CI_{50}$  variaron de 0.734 a 13.091  $\mu\text{g/mL}$ , 0.010 a 4.258  $\mu\text{g/mL}$  y 0.140 a 76.806  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Sin embargo, los aislamientos fueron menos sensibles al tiofanato-metilo y carbendazim. Asimismo, Du *et al.*, 2017,

analizaron la sensibilidad micelial de 214 aislados de *B. maydis* a 3 fungicidas, los resultados de la  $CI_{50}$  de los aislados testeados para tebuconazole, piraclostrobina y meptildinocap fueron 0.024 a 21.582  $\mu\text{g/mL}$ , 0.032 a 0.724  $\mu\text{g/mL}$  y 0.146 a 3.412  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Por otro lado, Han *et al.* (2017) usaron 100 aislados para establecer la sensibilidad de *B. maydis* a fludioxonil durante los periodos de 2015-2016. Los resultados mostraron que la sensibilidad varió entre los 0.044 y 0.022  $\mu\text{g/mL}$ . Se corroboraron un total de 5 mutantes resistentes al ingrediente activo fludioxonil ( $\text{FRS} > 100$ ).

Los valores de FRS obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* estuvieron en el rango de 0.1 a 2.4, mediante la obtención de estos valores fue posible comprobar que existe aislados con una posible reducción de la sensibilidad (aislados con  $\text{FRS} > 1$ ) (Tabla 2.11). Estos aislados resultaran claves en el abordaje de futuras investigaciones en donde el objetivo principal sea el monitoreo de la sensibilidad de este patógeno.

De acuerdo con nuestro conocimiento, esta tesis representa el primer informe a nivel mundial de sensibilidad para una población de *B. sorokiniana*, muestreada en Argentina. Si bien este hongo siempre está presente en los campos de cebada de la provincia de Buenos Aires, la mayoría de los estudios de fungicidas en cebada se han centrado en el patógeno *Ramularia collo-cygni*, causante del salpicado necrótico en cebada, que en la Argentina ha demostrado ser una enfermedad más grave que la mancha borrosa (Havis *et al.*, 2014a; Carmona *et al.*, 2013). La evaluación de la resistencia de los patógenos a los fungicidas es difícil ya que su desarrollo solo se puede detectar cuando hay datos preliminares (de referencia) que se puede usar como línea de base de  $CI_{50}$  (De Waard, 2006).

## 2.5 CONCLUSIONES

Según lo informado por la comunidad científica y atendiendo a las concordancias de los parámetros morfológicos evaluados en esta tesis con la de los diversos autores, se confirma que los distintos aislados son del género *Bipolaris*, especie *sorokiniana*.

Todos los aislados evaluados son sensibles a los fungicidas testeados y no se encontraron aislados resistentes en el presente trabajo. Mediante el cálculo del FRS fue

posible identificar aislados con una potencial reducción de la sensibilidad. Por ende, todos los fungicidas fueron clasificados como altamente fungitóxicos en la inhibición del crecimiento micelial para los aislados de *B. sorokiniana*.

Las mezclas de estrobilurinas más triazoles y carboxamidas mostraron una mayor eficiencia en la inhibición del crecimiento micelial en comparación a las mezclas de triazoles y estrobilurinas.

Esta es una investigación preliminar realizada *in vitro* para conocer la sensibilidad de los aislados de *B. sorokiniana* ante los diferentes fungicidas. En el próximo capítulo se presentan los efectos del fungicida más fungitóxico sobre la severidad e incidencia de la enfermedad, bajo condiciones de invernáculo.

## **Capítulo III:**

**Efecto “*in vivo*” del fungicida sobre dos aislados  
de *Bipolaris sorokiniana* en plantas de cebada**



### 3.1 INTRODUCCIÓN

El control químico es tal vez una de las medidas más utilizadas en la agricultura, por poder prevenir infecciones de patógenos que puedan instalarse en el cultivo y/o controlar infecciones ya instaladas en los tejidos de la planta hospedante (Zambolim *et al.*, 2007). En el mundo se han informado cerca de 68 géneros de patógenos asociados al cultivo de cebada, incluyendo hongos, bacterias y virus (Pereyra, 1996; Mathre, 1997; Stefansson y Hallsson, 2011; Franckowiace *et al.*, 2014; Kiehr *et al.*, 2016; Carmona y Sautua, 2016).

Una sustancia química en función de sus características inherentes a una molécula química, presenta fungitoxicidad. Por otro lado, un hongo, en función a sus características genéticas presenta o no, sensibilidad a una determinada molécula. Si un hongo es sensible a un fungicida, este presenta fungitoxicidad, caso contrario, el fungicida no es tóxico. Si el fungicida no presenta fungitoxicidad, el hongo es considerado insensible (Reis *et al.*, 2007, Reis y Carmona, 2011).

Debe comprenderse que la acción principal de un fungicida es interactuar con su principal objetivo por el cual fue creado; el hongo (Reis y Carmona, 2013; Carmona *et al.*, 2014b). De esta forma, para enfermedades de difícil predicción, resulta necesario aceptar un determinado nivel de daño (identificado por síntomas y signos, como manchas foliares y estructuras fúngicas), para tener certeza de la presencia de la población del patógeno en el campo (Carmona y Sautua, 2016).

El tratamiento con fungicidas de semillas infectadas solamente es recomendado para lotes con incidencia inferior al 30%, por encima de ese valor la eficacia del producto está comprometida (Embrapa Trigo, 2010). Por ese motivo es necesario el diagnóstico adecuado de la presencia de *B. sorokiniana* en campos de cebada. Aunque el uso de fungicidas en semilla retrasa el inicio de la enfermedad proporcionando control y/o la supresión de muchas enfermedades por un período de tiempo, en muchos casos y según el monitoreo de la enfermedad en el lote, resulta inevitable la necesidad de aplicaciones foliares de fungicidas.

Muchas metodologías se han descrito para la medición de la fungitoxicidad de una sustancia química (American Phytopathological Society, 1947; Sharvelle, 1961; Georgopoulos, 1982; Russel, 2004), teniendo como objetivo de estudio, en sí, la

sensibilidad de un hongo a un determinado fungicida o el monitoreo de la reducción parcial o incluso la pérdida de la sensibilidad (resistencia).

La cuantificación de la sensibilidad de una población de hongos a un fungicida puede ser realizada de manera *in vivo* o *in vitro* (Russel, 2004). Las pruebas *in vivo* generalmente incluyen una parte destacada de la planta a inocular (principalmente hojas), discos o fragmentos de hojas depositadas sobre medio de cultivo conteniendo fungicidas, o en todo caso, la planta entera (Holmes y Channon, 1984; Reuveni *et al.*, 1985; Cook, 1989; Genet *et al.*, 1997; Ghini y Kimati, 2000; Arraiano *et al.*, 2001; Miller y Gubler, 2004; Russel, 2004; Reis *et al.*, 2005).

Debido a la dificultad que representa extrapolar los resultados *in vitro*, se torna necesario complementar con ensayos *in vivo*. Este capítulo presenta una metodología que incluye la evaluación de parámetros *in vivo*, tratando de reflejar y a la vez validar los resultados de  $CI_{50}$  obtenidos en laboratorio, de manera de entender el comportamiento de los aislados cuando son inoculados sobre el hospedante y de cómo el fungicida repercute sobre la mancha borrosa en un ambiente controlado.

Se propusieron como objetivos: a) Evaluar a nivel “*in vivo*” la sensibilidad de los aislados más y menos sensibles a la aplicación del fungicida que resultó con mayor fungitoxicidad en la prueba “*in vitro*”, y b) Evaluar el efecto preventivo y curativo del fungicida que resultó con mayor fungitoxicidad en la prueba “*in vitro*”.

### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los tratamientos consistieron, por una parte, en la inoculación de plantas de cebada con una suspensión de conidios de los aislados más y menos sensibles a los fungicidas testeados *in vitro*, y, por otra parte, la aplicación en distintos momentos de aplicación del fungicida con mayor control micelial “*in vitro*” tal como se detalla en la Tabla 3.1.

Puesto que no hubo diferencia significativa entre los valores promedios de  $CI_{50}$  de los cinco fungicidas en general para los 10 aislados (Tabla 2.5), se consideró como aislado más sensible a aquel que presentó el menor valor de  $CI_{50}$  (CB 0.18  $\mu\text{g/mL}$ ) y al aislado menos sensible a aquel que presentó el mayor valor de  $CI_{50}$  (DB 0.44  $\mu\text{g/mL}$ ) procedentes del ensayo *in vitro*.

Tabla 3.1 Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Descripción
T <sub>1</sub>	Testigo sin inoculación ni pulverización química
T <sub>2</sub>	Testigo con pulverización química
T <sub>3</sub>	Aplicación de la cepa de mayor sensibilidad (aislado CB)
T <sub>4</sub>	Aplicación de la cepa de menor sensibilidad (aislado DB)
T <sub>5</sub>	Aplicación del fungicida 24 horas después de la aplicación del aislado CB
T <sub>6</sub>	Aplicación del fungicida 24 horas después de la aplicación del aislado DB
T <sub>7</sub>	Aplicación del fungicida 24 horas antes de la aplicación del aislado CB
T <sub>8</sub>	Aplicación del fungicida 24 horas antes de la aplicación del aislado DB

El experimento se desarrolló en los invernáculos ubicados en el predio de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA). Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado con 4 repeticiones, donde la unidad experimental estuvo constituida por una maceta con 5 plantas de cebada.

### 3.2.1 Material vegetal

Se utilizó semillas de cebada de la variedad Shakira por ser una de las más sembradas y a la vez susceptible a la mancha borrosa. Para comprobar que dicha variedad escogida era susceptible a *B. sorokiniana* se realizaron los postulados de Koch en plantines de cebada. Una vez que se confirmó la infección, se compararon las lesiones foliares con una escala diagramática propuesta por Fetch y Steffenson, (1999), la cual establece cuán susceptible o resistente es una variedad. Previamente, las semillas fueron sembradas en blotter test a razón de 25 semillas por placas de petri, totalizando 4 placas a fin de verificar la presencia de *B. sorokiniana* o algún otro patógeno que pudiera inferir en los resultados de las inoculaciones. Puesto que las semillas presentaban una incidencia del 2% del patógeno objetivo, se trató el lote de semillas con el fungicida iminoctadine 30% EC con una dosis de 210 ml/100 kg que logra erradicar a los patógenos de los géneros *Bipolaris*, *Pyrenophora* y *Alternaria* (Carmona *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2010). Posterior al tratamiento, las semillas fueron analizadas en APG para confirmar la eliminación del hongo.

### 3.2.2 Preparación de macetas

Como sustrato para los plantines de cebada se utilizó una mezcla de Growmix Multipro de Terrafertil y arena fina en una proporción de 4:1 respectivamente (Fig. 3.1). El sustrato fue cargado en macetas de plástico de 12 cm x 15 cm x 9 cm de color negro hasta  $\frac{3}{4}$  parte de su capacidad. Se sembraron 10 semillas por maceta de manera equidistante a una profundidad de 4 cm aproximadamente. Las macetas fueron mantenidas en invernadero con ventilación controlada y regadas con ADE de forma diaria hasta capacidad de campo (80%) durante todo el experimento (Fig. 3.2).



Figura 3.1 Mezcla de sustrato, proporción 4 de Growmix por 1 de arena fina.

Pasado los 15 días después de la siembra se realizó un raleo a fin de obtener una densidad de 5 plantas por maceta.





**Figura 3.2** Experimento en plantas de cebada inoculada con dos aislados de *B. sorokiniana* en condiciones de invernáculo.

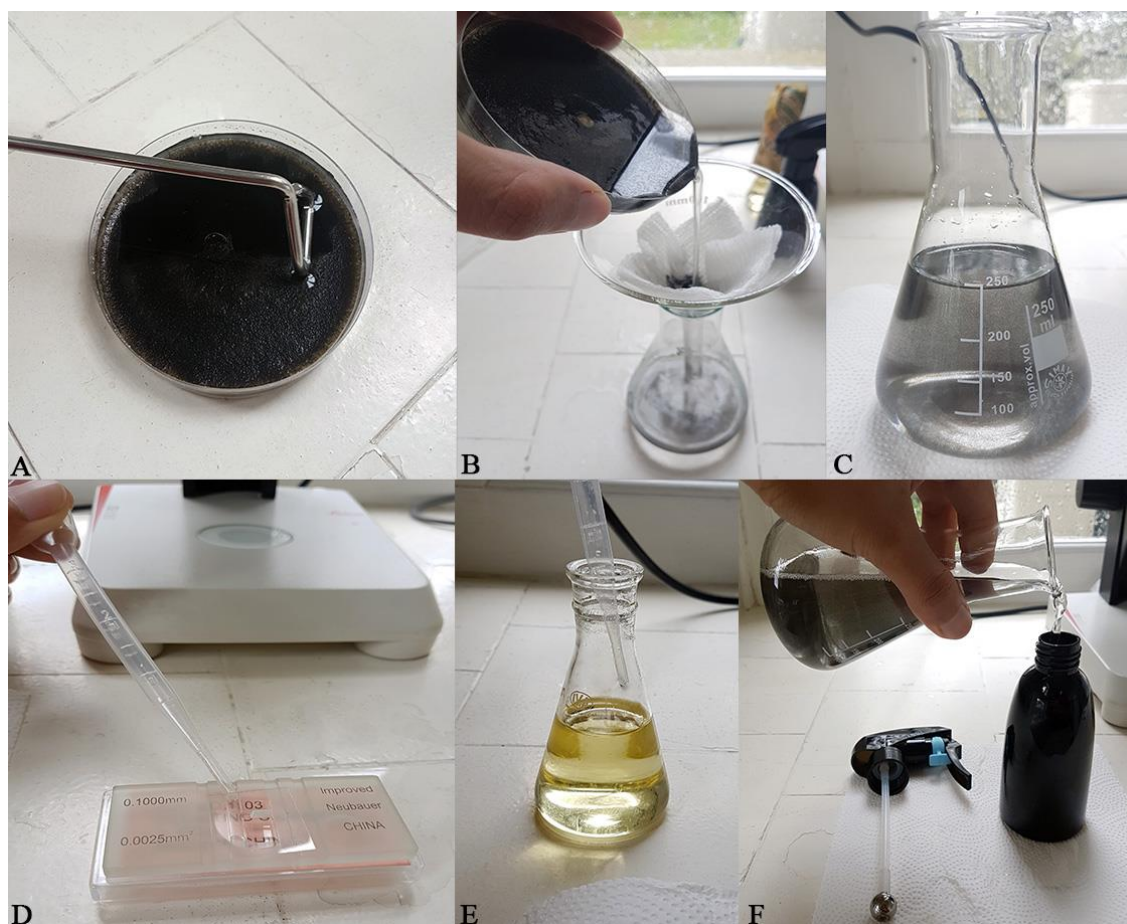
### 3.2.3 Preparación del inóculo

Se seleccionaron dos aislados de *B. sorokiniana*, el más sensible (aislado CB) y menos sensible (aislado DB) a los principios activos testeados en el ensayo de la  $CI_{50}$  “*in vitro*”. A continuación, se prepararon dos soluciones de conidios para realizar las inoculaciones.

A partir de cultivos puros de doce días de edad contenidos en placas de petri, se preparó una suspensión de conidios en ADE. Se procedió a depositar sobre la colonia del hongo 10 ml de ADE dejándolo reposar por 1 minuto, y con la ayuda de una espátula de Drigalsky se raspó suavemente la superficie de la colonia a fin de remover la mayor cantidad de conidios posibles (Fig. 3.3A). Luego se filtró el ADE conteniendo los conidios con una gasa de hilo esterilizado a fin de separar conidios de restos de micelios o medio de cultivo indeseado (Fig. 3.3B). La suspensión de conidios se vertió en una erlenmeyer conteniendo 250 ml de ADE. Se procedió a aforar la suspensión a 250 ml para luego mezclar solución durante 2 minutos a fin de homogeneizar la solución (Fig. 3.3C).

Luego, se pipeteó 0.01 mL de la suspensión de conidios de 250 mL y se depositó sobre una cámara de Neubauer (Tipo H) para el conteo de conidios (Fig. 3.3D). Con la ayuda de un microscopio (magnitud X40) se cuantificó la cantidad de conidios en cinco cuadrantes del hematocitómetro. Para cuantificar el número de conidios/ml, se multiplicó la sumatoria de los cinco cuadrantes por 2000. La concentración final fue

ajustada a  $1 \times 10^5$  conidios/mL mediante la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , donde,  $C_1$  es la concentración inicial de la solución;  $V_1$  es el volumen inicial de la solución;  $C_2$  es la concentración final después de diluir y  $V_2$  es el volumen final de la solución. Una vez realizado el conteo de conidios, se procedió a colocar el tensoactivo tween 20 (2 gotas/L) (Reis *et al.*, 2014) a la suspensión de conidios (Fig. 3.3E), para luego ser depositado en un atomizador manual (Fig. 3.3F).



**Figura 3.3** Proceso de preparación de la solución de conidios. (A) Raspado superficial de la colonia; (B) Filtrado de la suspensión de conidios; (C) Aforo con ADE y homogenización de la solución; (D) Pipeteo de la solución de conidios a un hematocitómetro tipo H; (E) Pipeteo de una 1 gota de tensoactivo; (F) Solución ajustada a  $1 \times 10^5$  conidios/mL vertida en un atomizador manual.

### 3.2.4 Inoculación en plantas de cebada

En invernadero, plántulas de 25 días de edad fueron inoculados con la suspensión ajustada de conidios de  $1 \times 10^5$  conidios/mL (Dominguez y Grabowski, 2017), tanto del aislado DB (menos sensible) como del aislado CB (más sensible). Con la ayuda de un atomizador manual (Fig. 3.3F) se inoculó cada maceta a razón de aproximadamente 10

mL de suspensión por planta de cebada entre los estados vegetativos Z1.4 (Producción de hojas, 4 hojas en el tallo principal) según la escala de Zadocks *et al.*, 1974. Inmediatamente luego de la inoculación, las macetas fueron cubiertas en su totalidad con plástico transparente previamente atomizado con ADE en las paredes internas, para asegurar una alta humedad relativa (aproximadamente 95%) y dar las condiciones favorables para que ocurra la infección (Fig. 3.4). Las macetas fueron mantenidas en esas condiciones durante 24 horas, después de ese período, las bolsas fueron retiradas.



Figura 3.4 Maceta cubierta con plástico humedecido, creando así un microclima para favorecer las condiciones de infección del patógeno.

Con la ayuda de un termómetro digital se monitoreo la temperatura dentro del invernáculo, manteniéndolo así hasta los 30 °C, en caso de sobrepasar esa temperatura (medio día), se procedía a abrir parcialmente las ventanas laterales para su ventilación inmediata.



De los cinco fungicidas analizados, el fungicida fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole fue seleccionado para la prueba *in vivo* por presentar el valor más bajo de  $CI_{50}$  ( $0.05 \mu\text{g/mL}$ ) y diferir significativamente entre los demás fungicidas (Tabla 2.4).

Para evaluar el efecto preventivo del fungicida, 24 horas antes de la inoculación con la suspensión de conidios, se aplicó el fungicida ( $T_7$  y  $T_8$ ). Las macetas se inocularon como se describió anteriormente. Por otra parte, para verificar el efecto curativo, primero se inocularon las plantas, pasado las 24 horas de inoculadas, se procedió a la aplicación del fungicida ( $T_5$  y  $T_6$ ).

La dosis utilizada de fungicida fue de  $1.2 \text{ l/ha}$ , recomendada por el marbete del fabricante. Para la aplicación se utilizó una mochila de presión constante con  $\text{CO}_2$ , con botalón de 2 metros de longitud con 4 picos abanico plano uniforme (Pastilla: TeeJect 110 015 VP), con una erogación de  $100 \text{ l/ha}$  a presión constante ( $40 \text{ libras pulgada}^{-2}$ ), accionada mediante tubo de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a un paso de  $5,04 \text{ km/h}$ . Para la aplicación se utilizaron elementos de protección personal (EPP) como traje/Tybeck, guantes, máscaras con filtro de carbono, entre otros (Fig. 3.5).



**Figura 3.5** Aplicación de fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%) a razón de  $1.2 \text{ L/ha}$ , 24 días post-emergencia de las plantas de cebada (Estado vegetativo Z1.4).



Las plantas de control se trataron solamente con ADE de la misma manera que las plantas experimentales. Para comprobar que el fungicida no presentaba acción fitotóxica sobre las plantas de cebada, se agregó un tratamiento blanco que consistió solo en la aplicación del producto químico. El ensayo se realizó 2 veces para garantizar la precisión de los resultados.

### 3.2.5 Parámetros evaluados y análisis estadístico

#### 3.2.5.1 Porcentaje de incidencia, severidad y eficacia de control

Posterior a los 15 días después de la inoculación (DDI), se estimaron los valores de la incidencia y de severidad foliar. La incidencia se determinó según la siguiente ecuación,  $I (\%) = \text{Número } he / Th * 100$ ; (donde: he = hojas enfermas; Th = total de hojas). Para la determinación de la severidad, previamente a las mediciones se realizó un entrenamiento visual con la ayuda del programa informático “Distrain” (Tomerlin y Howell, 1988). Luego en el invernadero, se evaluaron las 4 primeras hojas comparando las lesiones foliares con la escala grafica propuesta por James, (1974) (Fig. 3.6). El valor de la severidad fue obtenido mediante la siguiente fórmula,

$S (\%) = \Sigma he / Th * 100$  (donde:  $\Sigma he$  = sumatoria de hojas enfermas; Th = total de hojas).

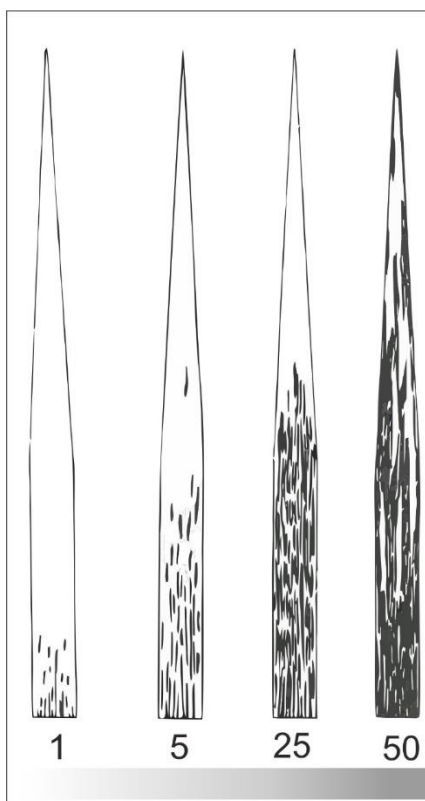


Figura 3.6 Escala diagramática propuesta por James, (1974) para manchas foliares en trigo y cebada.

Una vez obtenidos los valores severidad de los diferentes tratamientos, se determinó el porcentaje (%) de control con la siguiente fórmula (Daniels y Latin, 2013):

$$\text{Eficiencia del Control} = \frac{\% \text{ de severidad del testigo} - \% \text{ de severidad del tratamiento}}{\% \text{ de severidad del testigo}} * 100$$

### 3.2.5.2 Cuantificación del número y tamaño de lesión

Se midió con regla de precisión el diámetro en milímetros (mm) de las lesiones. Con la ayuda de una lupa de mano, también se cuantificó el número de lesiones por cm<sup>2</sup> de cada hoja infectada (4 primeras hojas) (Fig. 3.7). Luego se sumó y dividió por el número de hojas evaluadas, para obtener un valor promedio.

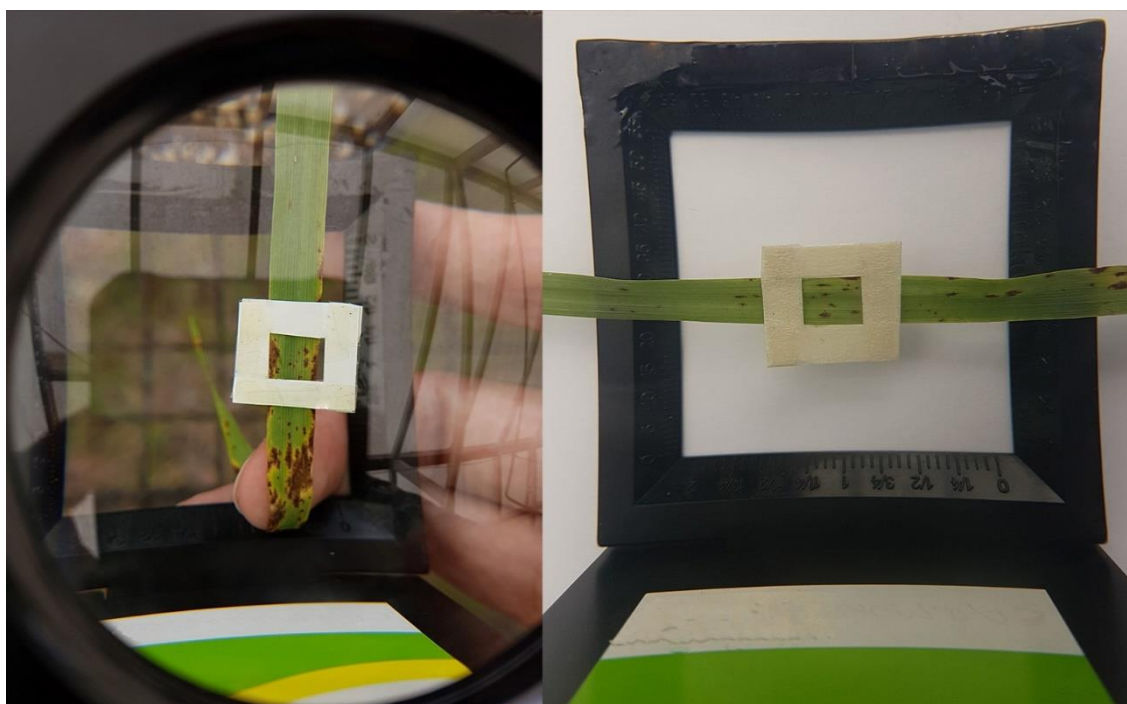


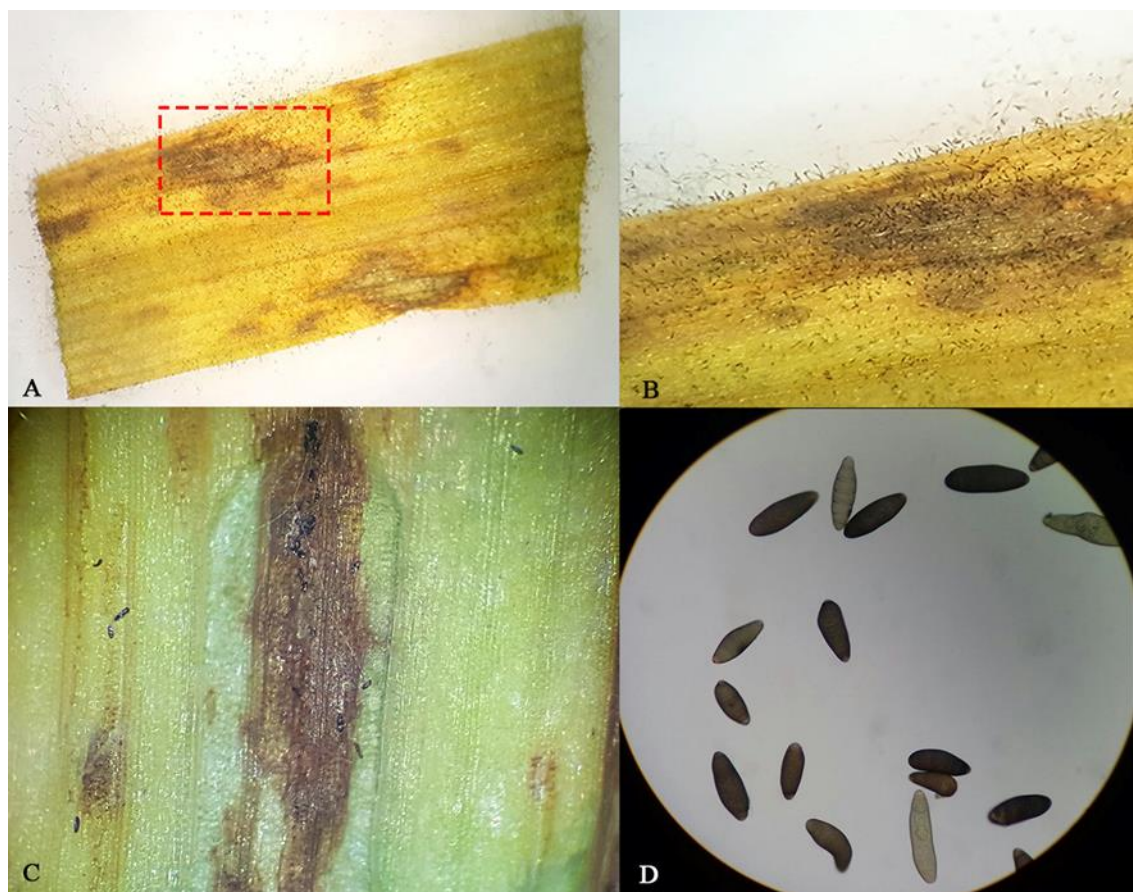
Figura 3.7 Cuantificación de lesiones por cm<sup>2</sup> de hoja de cebada causadas por el patógeno *B. sorokiniana*.

Debido a que los datos obtenidos en las evaluaciones no cumplieron con los supuestos de normalidad en la distribución de los errores, se analizaron por medio de la prueba no

paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existieron diferencias entre los tratamientos, utilizando el programa estadístico InfoStat (2011).

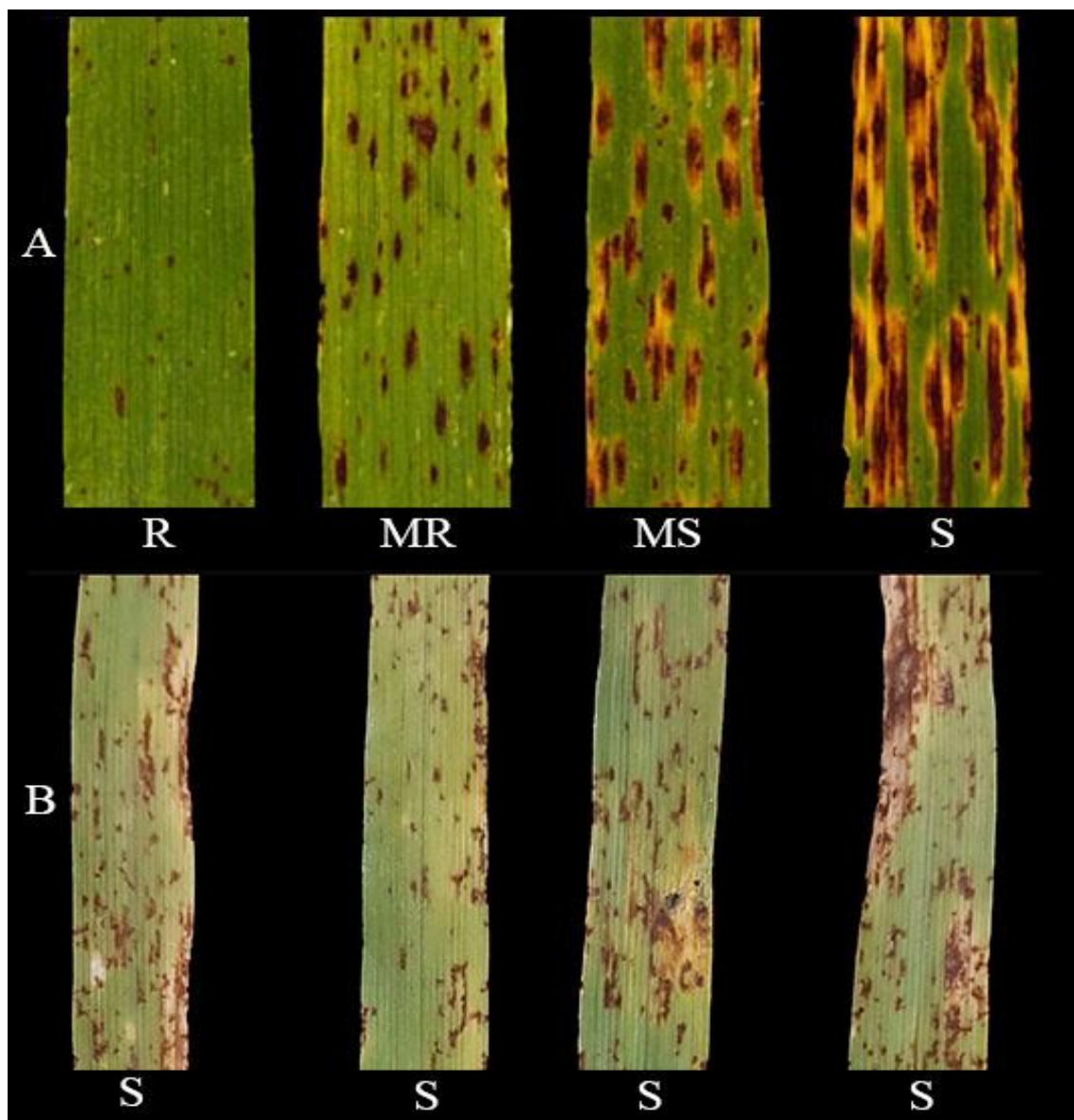
### 3.3 RESULTADOS

La variedad Shakira está catalogada como susceptible a la mancha borrosa causada por *B. sorokiniana* (Erreguerena, 2018; Erreguerena y Quiroz, 2016), además de ser uno de los cultivares más sembrados en las últimas campañas (Carmona y Sautua, 2015). Mediante los postulados de Koch, se llegó a determinar que los signos y síntomas expresados por las plantas inoculadas corresponden a la expresión patógena de los aislados inoculados (Fig. 3.8). Por lo tanto, se confirma la patogenicidad de los dos aislados de *B. sorokiniana* sobre esta variedad de cebada.



**Figura 3.8** Fragmentos de tejido enfermo sometidos a cámara húmeda. (A) Ampliación de lesión con esporulación; (B) Abundante producción de conidios; (C) Conidios característicos de *B. sorokiniana* (D) Observación de conidios bajo microscopio 40X.

Comparando las hojas infectadas con la escala diagramática de Fetch y Steffenson, (1999) (Fig. 3.9), se aprecia que las lesiones foliares tienen un patrón que sugieren la susceptibilidad de la variedad al fitopatógeno *B. sorokiniana*. Esta escala contempla 4 niveles, que va desde resistente, moderadamente resistente, moderadamente susceptible hasta la susceptibilidad total de la variedad.



**Figura 3.9** Comparación visual de hojas enfermas: bloque A (lado superior) escala diagramática propuesta por Fetch y Steffenson (1999) versus bloque B (lado inferior) hojas de cebada con 15 DDI. Donde; R: resistente; MR: moderadamente resistente; MS: moderadamente susceptible; S: susceptible.

En las semillas tratadas con iminoctadine 30% no se observó la presencia de *B. sorokiniana* u otro patógeno (micelio o conidios) que pueda repercutir en las lecturas de los ensayos posteriores, lo que garantiza que los síntomas observados en plantas de cebada fueron producto de la inoculación.

### 3.3.1 Incidencia, severidad de *B. sorokiniana* en plantas de cebada y eficacia del control

De acuerdo con la Tabla 3.2, se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en cuanto a la severidad ( $P = 0.0008$ ), la incidencia ( $P = 0.0018$ ) y el porcentaje de control ( $P = 0.0065$ ).

Tabla 3.2 Efecto de fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole en diferentes momentos de aplicación. Porcentaje de incidencia en planta, severidad en hojas y porcentaje de control evaluadas a los 15 DDI

Tratamiento Aislado	Momento aplicación	Severidad	E.E.	Incidencia	E.E.	Porcentaje control	E.E.
3 CB		21.81 b*	1.02	72.5 b	2.5	0	-
4 DB		24.85 b	3.16	75 b	3.75	0	-
5 CB	24 hs.	4.89 ab	0.95	73.77 b	1.25	72.75 a	5.71
6 DB	DDI**	3.66 ab	0.24	67.50 ab	3.23	84.41 a	2.36
7 CB	24 hs.	0.06 a	0.06	2.50 a	1.5	99.72 b	0.28
8 DB	ADI	0.03 a	0.03	1.25 a	0.75	99.88 b	0.12

\*Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Prueba de Kruskal Wallis).

\*\*DDI (después de la inoculación);ADI (antes de la inoculación).

La severidad para las plantas inoculadas con los aislados CB y DB fue de 21.81 y 24.85 % respectivamente (Fig. 3.11F; Fig. 3.10B). No hubo diferencia estadística entre los valores de incidencia y severidad para las plantas inoculadas 24 horas antes ( $T_5$  y  $T_6$ ) y 24 horas después ( $T_7$  y  $T_8$ ) de la aplicación del fungicida.

Para las plantas que primero fueron inoculadas y posteriormente recibieron el fungicida ( $T_5$  y  $T_6$ ), el valor de la severidad fue de 4.89 % (aislado CB) y 3.66 (aislado DB) respectivamente (Fig. 3.11G; 3.10C).

En el caso de las plantas que primero recibieron la aplicación del fungicida y luego fueron inoculadas ( $T_7$  y  $T_8$ ), ambos aislados registraron valores de severidad por debajo del 1 %; 0.06 y 0.03 %, aislado CB y DB respectivamente (Fig. 3.11H; Fig. 3.10D).

En tanto, los valores de control ascendieron de 72.75 a 84.41 % para las plantas que recibieron el fungicida 24 horas después de la inoculación con el patógeno, y un control

que se podría considerar del 100 % en plantas que se inocularon 24 horas después de la aplicación del producto.





Figura 3.10 Lesiones en hojas causadas por el aislado menos sensible (DB). (A) Testigo sin inoculación; (B) Testigo inoculado con la suspensión conidial (promedio de 24.2 % de severidad); (C) Efecto curativo del fungicida (promedio 3.6 % de severidad); (D) Efecto preventivo del fungicida (severidad < 1 %).



Figura 3.11 Lesiones en hojas causadas por el aislado más sensible (CB). (E) Testigo sin inoculación; (F) Testigo inoculado con la suspensión conidial (promedio de 21.8 % de severidad); (G) Efecto curativo del fungicida (promedio de 4.8 % de severidad); (H) Efecto preventivo del fungicida (severidad < 1 %).



En cuanto al porcentaje de incidencia se pueden distinguir claramente dos grupos, los tratamientos que primeramente recibieron la suspensión conidial (T<sub>5</sub> aislado CB y T<sub>6</sub> aislado DB) que presentaron valores altos de incidencia, en contraste con los tratamientos que recibieron la inoculación 24 horas después de la aplicación del fungicida (T<sub>7</sub> aislado CB y T<sub>8</sub> aislado DB), cuyos valores fueron relativamente bajos, 2.5 y 1.8 % respectivamente.

Todos los tratamientos a los cuales se le aplicó el fungicida indistintamente al tiempo de aplicación mostraron valores óptimos de control (> 70%). Para los tratamientos T<sub>5</sub> aislado CB y T<sub>6</sub> aislado DB (curativo) no hubo diferencias estadísticas entre ellos en comparación con el testigo, sin embargo, hubo diferencia con los T<sub>7</sub> aislado CB y T<sub>8</sub> aislado DB (preventivo) con los tratamientos T<sub>5</sub> aislado CB y T<sub>6</sub> aislado DB (curativo). La eficacia de control varió entre el 72.5 al 99.8% entre los diferentes tratamientos.

Mediante el tratamiento 2 se confirmó que la dosis de fungicida aplicada en estos tratamientos no causó daño foliar, es decir, no ejerció un efecto fitotóxico sobre las hojas. Por otro lado, el tratamiento 1 confirmó que no hubo transmisión del patógeno de la semilla a las distintas partes de la planta. Para ambos tratamientos (T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>) las plantas se encontraban erectas, vigorosas, con hojas libres de cualquier tipo de lesión o manchas, garantizando así los resultados obtenidos en los demás tratamientos (3; 4; 5; 6; 7 y 8).

### **3.3.2 Cuantificación del número y tamaño de lesión**

El número de lesiones mostró diferencias ( $P = 0.0041$ ) de acuerdo al tratamiento. El promedio de lesiones varió de 1 a 11 por cm<sup>2</sup> entre los tratamientos que recibieron el fungicida (T<sub>5</sub> aislado CB, T<sub>6</sub> aislado DB, T<sub>7</sub> aislado CB y T<sub>8</sub> aislado DB) y los que no (T<sub>3</sub> CB y T<sub>4</sub> DB), respectivamente. Así también se registró una diferencia significativa ( $P > 0.0001$ ) en cuanto al tamaño de las lesiones, el rango de tamaño estuvo entre los 0.22 y 8.78 mm (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Efecto de fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole sobre el promedio del número de lesiones por cm<sup>2</sup> de hoja y tamaño de lesiones en mm

Tratamiento Aislado	Momento aplicación	Número de lesión por cm <sup>2</sup>	E.E.	Tamaño de lesión (mm)	E.E.
3 CB		10 b*	0.41	7.44 c	1.32
4 DB		11 b	2.27	8.78 c	1.87
5 CB	24 hs. DDI**	7.75 ab	1.03	2.78 b	1.18
6 DB		8.75 b	1.7	1.78 b	0.46
7 CB	24 hs ADI	0.25 a	0.25	0.22 a	0.15
8 DB		0.75 a	0.75	0.56 ab	0.34

\*Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Prueba de Kruskal Wallis).

\*\*DDI (después de la inoculación);ADI (antes de la inoculación).

Si bien los tratamientos 5 y 6 fueron estadísticamente iguales a los tratamientos 3 y 4 en cuanto al número de lesiones, se pudo corroborar que el tamaño de las lesiones fue menor indistintamente al aislado inoculado. Los tratamientos 7 y 8 presentaron un nivel muy bajo o nulo número de lesiones, y el tamaño de las lesiones no fue mayor a 1 mm.

### 3.4 DISCUSIÓN

En este ensayo, la inoculación fue exitosa registrándose que la variedad Shakira demostró ser susceptible al patógeno *B. sorokiniana* y esto permitió detectar diferencias en el comportamiento de las plantas tratadas en lo que hace al desarrollo de las lesiones, entre el testigo inoculado y las plantas tratadas con el fungicida. La inexistencia de restos culturales infestados en el sustrato, y la ausencia de lesiones en el control sin inocular (semilla sin inóculo), permitieron corroborar que la suspensión de conidios constituyó la única fuente de inóculo.

Hay varios informes iniciales sobre la presencia de sustancias fitotóxicas en los aislados de *B. sorokiniana* (Gayad, 1961; Ludwig, 1957). El hongo produce toxinas sesquiterpenoides que se sintetizan a partir de farnesol. Se han aislado aproximadamente 20 compuestos relacionados con helmintosporol de diferentes especies del género *Bipolaris* (Kachlicki, 1995; Turner y Aldridge, 1983). El Prehelmintosporol es el compuesto más abundante y activo de *B. sorokiniana*, que produce de entre 1.2 – 2.1

$\mu\text{g}/\text{mg}$  de materia seca de tejido fúngico (Carlson *et al.*, 1991). Aunque la sensibilidad al prehelmintosporol de los cultivares de cebada no se correlaciona directamente con los niveles de resistencia a la enfermedad, se supone que desempeña un papel en la patogénesis al matar o debilitar las células de las plantas (Liljeroth *et al.*, 1993; Kumar *et al.* 2002).

La elevada incidencia en los tratamientos 3 (aislado CB), 4 (aislado DB), 5 (aplicación del fungicida 24 horas después de la inoculación del aislado CB) y 6 (aplicación del fungicida 24 horas después de la inoculación del aislado DB), que primeramente fueron inoculados corresponde al óptimo desarrollo del hongo debido a las condiciones favorables a las que fueron sometidas en el invernadero. Además de utilizar la cantidad adecuada de suspensión conidial para generar la enfermedad.

Una de las características más importantes de un fungicida es su eficacia de control, además del rango de patógenos que este controla (Balardin *et al.*, 2011). En este ensayo el porcentaje de control fue elevado (mayor al 70 %) para todos los tratamientos en los que se aplicó el fungicida. Se encontró diferencias entre las plantas que primero recibieron la suspensión de conidios (tratamiento 5 y 6) y las plantas que primero recibieron el fungicida (tratamiento 7 y 8). Mediante la triple mezcla de triazol + estrobilurina + carboxamida no solo se logra aumentar el espectro de acción sino también el periodo de protección, dado que se combinan el efecto preventivo de los dos últimos más el curativo del primero. De acuerdo con los tratamientos evaluados, fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%) demostró ser eficiente para el control de *B. sorokiniana* en condiciones de invernadero.

Los resultados de porcentaje de control encontrados en el ensayo en invernáculo eran lo esperado ya que ambos aislados utilizados presentaron valores de  $\text{CI}_{50}$  por debajo de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (DB; 0.118 y CB; 0.043  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a nivel *in vitro* que según la escala de Edgington *et al.*, (1971) fueron clasificadas como altamente sensibles al fungicida fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole. También es posible argumentar que el elevado porcentaje de control del fungicida están influenciado por los bajos niveles de enfermedad observados en el testigo.

Las mediciones realizadas mediante el conteo del número de lesiones o manchas por planta fueron muy útiles para analizar las diferencias entre tratamientos debido a que

dicha determinación fue sencilla, de muy fácil seguimiento y principalmente objetiva lo que permite entender y representar la enfermedad.

Todas las plantas que fueron inoculadas presentaron manchas pequeñas color café oscuro, redondas y elípticas, que cubrieron después toda la hoja, así mostraron un aspecto de necrosis total, con esporulación abundante (Fig. 3.8). Estos síntomas observados fueron semejantes a lo que se reporta en la literatura, con manchas marrón oscuras, de forma elíptica y manchas inicialmente cloróticas, que con el tiempo necrosan (Reis *et al.*, 2001).

Este fungicida (fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole) presenta en su composición química dos moléculas de acción preventiva, fluxapyroxad y piraclostrobina, respectivamente. Estos dos ingredientes activos son altamente eficaces, actuando en sitios de acción diferentes (complejo II y III de la mitocondria) otorgando un gran efecto de protección, lo cual se comprobó estadísticamente con los valores de severidad, porcentaje de control, número de lesiones y tamaño de lesión (Tablas 3.2 y 3.3).

De aquí a un tiempo, el control químico de las manchas foliares en cebada era recomendado cuando la severidad alcanzaba el 5% (Comisión, 2001). Ante los resultados obtenidos en este trabajo, este umbral de acción es muy elevado. Se considera que las lesiones iniciales son pequeñas, a menudo menores de 1 mm<sup>2</sup>, y que una hoja de cebada puede tener un área de 15 a 20 cm<sup>2</sup>, de 7500 a 10000 lesiones serían necesarias para formar un área foliar afectada del 5%. Sabiendo que estas evolucionan significativamente y que el efecto de aplicaciones curativas sobre la expansión es mínimo, las recomendaciones debería ser un tema de análisis. Siendo que la evaluación de la severidad es un método muy subjetivo y laborioso, el método orientado en los umbrales de daños económicos (UDE) en valores de incidencia resulta de una medición objetiva, sencilla y práctica para el productor (Carmona *et al.*, 2014b).

En el trabajo realizado por Prates y Fernandes (2001), con la mancha marrón en trigo, causada por el hongo *Bipolaris sorokiniana*, la temperatura también ejerció influencia en la expansión de las lesiones, siendo que las tasas fueron más elevadas en las temperaturas de 23 a 30 °C. En las epifitias naturales la tasa de expansión de lesión, en diferentes patosistemas, además de la temperatura, puede variar en función de otros factores como la posición de la hoja (Eckhardt *et al.*, 1984), edad de la lesión o del

hospedante (Ubbarao y Michailides, 1995) y la densidad de lesiones (Ranzi *et al.*, 2015). En este trabajo, las variables mencionadas fueron uniformizadas, de modo de no influenciar en los resultados.

La expansión de la lesión es uno de los principales componentes de una epifitía, por lo tanto, la obtención de cultivares de cebada en que el tamaño final de la lesión de *B. sorokiniana* sea pequeña y la tasa de expansión sea baja es una característica altamente deseable, principalmente en regiones de temperaturas más altas (Prates y Fernandes, 2001).

Antoniazzi y Deschamps (2007) observaron una reducción del 90% en la severidad de mancha borrosa en plantas de cebada con dos aplicaciones de fungicida epoxiconazole. Sooväli y Koppel (2009) encontraron una reducción del 15% en la severidad de mancha borrosa en plantas de cebada con dos aplicaciones de fungicida triazol (tebuconazole). Kunhem *et al.* (2009) utilizaron dos aplicaciones de fungicida piraclostrobina + epoxiconazol, obtuvieron una reducción promedio de 82.6% y 97.4% en la roya de la hoja y el mildiú en plantas de cebada respectivamente. Es importante cuantificar el efecto de la aplicación química sobre la severidad de la enfermedad y la reducción del rendimiento para maximizar la eficiencia y el beneficio para los productores.

De acuerdo con Carmona *et al.* (2014b), Carmona y Sautua (2016), y Reis *et al.* (2010; 2016), el uso de fungicidas constituye una herramienta estratégica de gran utilidad que debe formar parte del manejo integrado de las enfermedades en el cultivo de cebada. Estos autores, asimismo mencionan que los resultados de numerosas experiencias muestran una tendencia favorable para la utilización de fungicidas, si bien variable de acuerdo a la región en cuestión, al momento de aplicación y dependiente de las condiciones ambientales durante el ciclo del cultivo.

En estudios previos en cebada (Entz *et al.*, 1999; Antoniazzi y Deschamps, 2007), trigo (Barros *et al.*, 2006) y avena blanca (Nerbass *et al.*, 2008), el aumento en el número de aplicaciones de fungicidas (2 a 3 aplicaciones) usado para controlar la mancha borrosa, la mancha en red y otras enfermedades foliares aumentaron la calidad granulométrica del grano (aproximadamente 60%) y el peso de 1000 semillas (aproximadamente 15%), estos datos son consistentes con los reportado por Agostinetto *et al.* 2015, en el cual también reportan un aumento considerable en la calidad granulométrica y en el peso de 1000 semillas. Feksa y Duhatschek 2005, quienes obtuvieron un incremento

significativo en el peso de mil semillas mediante el control de la mancha borrosa en cebada después de aplicaciones con fungicidas.

### 3.5 CONCLUSIÓN

La triple mezcla de fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8.1%) + epoxiconazole (5%) controló eficientemente ambos aislados de *B. sorokiniana*. Es decir, que la cepa más sensible como así también la cepa menos sensible procedentes del ensayo *in vitro*, resultaron ser altamente sensibles al fungicida *in vivo*, aplicado tanto antes (i.e. preventivo) como después de la inoculación (i.e. curativo).

Se evidenció la excelente acción preventiva de este fungicida sobre el proceso de producción y expansión de las lesiones, lo que enfatiza la necesidad de controlar las manchas foliares en la fase inicial de la epifitía.

## **Capítulo IV:**

### **Conclusiones generales**

*Bipolaris sorokiniana* es un agente patógeno que causa daños y pérdidas significativas en el cultivo de cebada (Rahman, 2011; Carmona y Sautua, 2015). La MB se encuentra en todas las regiones de producción de cebada del país (Kiehr *et al.*, 2016). Para controlar este patógeno es importante conocer su variación fisiológica, cultural, morfológica, genética y, sobre todo, como se comporta frente a los distintos principios activos de fungicidas utilizados en el manejo de enfermedades en el cultivo campaña tras campaña agrícola.

En este capítulo se abordarán los principales resultados de la tesis para desarrollar una síntesis general y se discutirá en qué medida los resultados obtenidos permiten rechazar o no las hipótesis planteadas en el Capítulo 1. Luego se destacará el aporte de dichos resultados al avance del conocimiento y sus posibles aplicaciones. Asimismo, se discuten las contribuciones de esta tesis al conocimiento y las líneas de investigación que podrían desprenderse de ella a futuro.

#### **4.1 Síntesis de los principales resultados**

A lo largo de la tesis se abordaron cinco objetivos particulares que fueron detallados en los capítulos II y III. El primer objetivo específico fue “Obtener aislados representativos de *B. sorokiniana* a partir de semillas provenientes de lotes comerciales de cebada del norte y sudeste de la provincia de Bs. As.”. Aproximadamente 60 muestras de semillas y material foliar con síntomas de mancha borrosa, provenientes de diversas regiones productoras del país, se recibieron en la Cátedra de Fitopatología de la Universidad de Buenos Aires. Del total de muestras, en 19 lotes fueron confirmados la presencia de *B. sorokiniana*, entre otros patógenos asociados al cultivo de cebada (*P. teres*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. *Cladosporium* spp. y bacterias sin identificar). Estos lotes fueron seleccionados de acuerdo a las localidades, campaña y variedad, de tal forma que los resultados sean lo más representativos posible. Partiendo de este punto, se planteó el segundo objetivo específico, que fue el de “Caracterizar morfológicamente los aislados de *B. sorokiniana* obtenidos”. Mediante los resultados obtenidos en el capítulo II (Tabla 2.3, Fig. 2.2), se lograron agrupar 10 aislados seleccionados en 3 grupos morfológicos. Los resultados permitieron concluir que los aislados de *B. sorokiniana* recolectados a partir de diferentes zonas agrícolas presentaban variabilidad morfológica entre sí.



A partir del objetivo específico 3 “establecer un perfil de sensibilidad de los aislados de *B. sorokiniana* a los principios activos fungicidas de las mezclas comerciales más utilizados en Argentina para el cultivo de cebada que contengan IQE, ISDH, IDM, mediante la determinación la  $CI_{50}$  para cada combinación aislado-fungicida se pusieron a prueba tres hipótesis, la N° 1; 2 y la 3. Para la hipótesis N° 1 (los principios activos fungicidas (IQE, ISDH, IDM) en mezclas comerciales, que frecuentemente se utilizan en el cultivo de cebada en la Argentina, no fueron determinados  $CI_{50}$  *in vitro* significativamente diferente entre sí para cada uno de los diferentes aislados de *B. sorokiniana*), el análisis de varianza marcó una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en cuanto a la sensibilidad de los aislados, en general, a los 5 fungicidas probados (Tabla 2.4). Por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa (los fungicidas testeados difieren entre sí en cuanto a la  $CI_{50}$ ).

La sensibilidad de los aislados de distinta procedencia geográfica no varió en función a los 5 fungicidas probados (Tabla 2.5) por lo cual se acepta la hipótesis N° 2 (la sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *B. sorokiniana* no es variable en función de la procedencia geográfica de las cepas).

Respecto al crecimiento micelial de los distintos aislados, estos variaron según el efecto de las concentraciones sobre los aislados, de manera que cuando más aumentaba la dosis ( $\mu\text{g/mL}$ ), menor fue el crecimiento micelial (mayor porcentaje de inhibición) (Fig. 2.5; 2.6; 2.7; 2.8 y 2.9), por consiguiente, se acepta la hipótesis N° 3 (La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *B. sorokiniana* es variable en función de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados).

En referencia a si era posible realizar una clasificación de la fungitoxicidad de los fungicidas testeados para los diferentes aislados (objetivo específico 4), se utilizó como parámetro el valor de  $CI_{50}$  obtenida para cada aislado y basándose en la clasificación propuesta por Edgington *et al.* (1971), se concluyó que todos los aislados fueron altamente sensibles a los dobles y triples mezclas de principios activos con los cuales fueron enfrentados, es decir, se rechaza la hipótesis N°4 (es posible clasificar los aislados de *B. sorokiniana* según su diferente sensibilidad a los fungicidas) y se acepta la hipótesis alternativa: que no puede ser diferenciada según la sensibilidad.

En el capítulo III, se evaluó el efecto del fungicida con mayor efecto fungitóxico (fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazole) sobre los aislados DB y CB (objetivo

específico 5). La severidad se redujo considerablemente desde 21.81 y 24.85% hasta 4.89 y 3.66% para los tratamientos curativos N° 5 (aislado CB) y 6 (aislado DB), logrando un 72.75 y 84.41% de control respectivamente; y fue menor al 1% (> 99% de control en ambos casos) para los tratamientos preventivos N° 7 (aislado CB) y 8 (aislado DB). Estos resultados evidenciaron el efecto preventivo y curativo temprano que estas moléculas tuvieron sobre la MB. Se concluyó que ambos aislados resultaron ser altamente sensibles a este fungicida razón por la cual se rechaza las hipótesis N° 5; (El aislado de menor sensibilidad de *B. sorokiniana* proveniente de la prueba *in vitro* presentará baja sensibilidad al fungicida de mayor fungitoxicidad a nivel *in vivo* y, por ende, el aislado de mayor sensibilidad de *B. sorokiniana* proveniente de la prueba *in vitro* presentará alta sensibilidad al fungicida de mayor fungitoxicidad a nivel *in vivo*)

Tanto en los experimentos *in vitro* como en los *in vivo*, los aislados demostraron un mismo comportamiento, y fueron clasificados como altamente sensibles a los fungicidas probados, resulta interesante valorar ambos tipos de ensayos ya que para estudios donde el objetivo principal es el monitoreo de la sensibilidad son un complemento a la hora de comparar los resultados.

## 4.2 Aportes logrados en el conocimiento

Esta tesis constituye el primer aporte de conocimiento a los valores reales de CI<sub>50</sub> de aislados de *B. sorokiniana* en la Argentina y a nivel mundial. Muchas de las investigaciones sobre este patógeno se centran en la elección de cultivares resistentes y/o el tratamiento de semilla, independientemente del principio activo que se esté aplicando, dando menos importancia al monitoreo de la sensibilidad y de cómo estas moléculas repercuten sobre las distintas cepas o poblaciones. También podría considerarse experiencias en trigo donde mediante la utilización de este método de monitoreo se puedan resolver problemas de resistencia y extrapolar al patosistema cevada-*Bipolaris*.

El presente trabajo permitió estimar que los aislados de *B. sorokiniana* aquí evaluados, muestreados a partir de poblaciones de la provincia de Buenos Aires, aún son sensibles a los principios activos fungicidas utilizados con mayor frecuencia (número de aplicaciones por periodo del cultivo). Es decir, no se detectó la presencia de aislados resistentes. Sin embargo, se individualizaron aislados con cierto nivel inicial de

reducción de la sensibilidad a los cinco fungicidas probados. Estos datos resultan relevantes porque indican que hay un indicio de inicio de reducción de sensibilidad y por lo tanto en las próximas campañas agrícolas se debe continuar con el monitoreo de la sensibilidad de las poblaciones de *B. sorokiniana* a los diferentes principios activos.

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo II, se ha verificado que existe variabilidad morfológica de las colonias de *B. sorokiniana* en las diversas regiones productoras de cebada. Esta característica podría ser importante para futuros trabajos de caracterización buscando marcadores genéticos que agrupen los aislados existentes mediante el uso de herramientas moleculares.

Se presenta una propuesta válida que incluye el empleo conjunto de pruebas *in vitro* e *in vivo* para el monitoreo de los niveles de sensibilidad de las poblaciones de fitopatógenos contra los cuales se utilizan los fungicidas, esta metodología podría ser factible para la evaluación de la sensibilidad en otros patosistemas.

### 4.3 Aplicaciones de los resultados

Mediante los resultados obtenidos en el capítulo II, se logró establecer un perfil de sensibilidad del patógeno *B. sorokiniana* a las mezclas fungicidas más utilizadas en Argentina. No se puede clasificar un aislado como sensible o resistente si con anterioridad no fue determinada una línea de base de ese patógeno antes del uso a gran escala del fungicida. A partir del valor de  $CI_{50}$  del aislado FB de la campaña 2000/01 (este valor de  $CI_{50}$  es considerado la línea base, es decir, es la concentración del producto que inhibió al patógeno en la primera aplicación) fue posible comparar con la  $CI_{50}$  de otros aislados de manera a determinar la posible pérdida de sensibilidad de los demás aislados (Tabla 2.11). Este aislado resultará de referencia primordial para la comunidad científica local. Por lo tanto, a partir de los resultados de la presente tesis se cuenta con información que servirá de línea base para futuros trabajos de monitoreo de la sensibilidad de poblaciones naturales de *B. sorokiniana* a los fungicidas más utilizados por los productores de cebada en Argentina.

Esta línea de base será útil para monitorear los cambios en aislados de este patógeno con respecto a la sensibilidad a estos fungicidas, a partir de estos resultados se tendrá un

perfil de sensibilidad lo que permitirá el monitoreo en tiempo real de la  $CI_{50}$  del patógeno, este proceso es clave para detectar la aparición de aislados mutantes.

A partir de ahora al momento de hacer un monitoreo de la sensibilidad a ciertas moléculas se tendrá un perfil inicial de la sensibilidad, esto permitirá determinar la  $CI_{50}$  del patógeno en tiempo real, permitiendo detectar la aparición de aislados potencialmente mutantes. La evaluación sistemática de las poblaciones de los fitopatógenos permite una temprana detección de los cambios de sensibilidad, lo que posibilita variar la estrategia de control de acuerdo con los mecanismos de acción de los ingredientes activos antes de que se produzcan las pérdidas económicas.

Esta información inédita ayudará a los técnicos a recomendar estrategias de gestión para el uso sostenible de fungicidas, como la promoción de la rotación de fungicidas. Además, la ocurrencia de una reducción generalizada de la sensibilidad puede alentar a los fabricantes de fungicidas a investigar nuevas moléculas y desarrollar estrategias para administrar los productos actuales.

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen al entendimiento del cambio en la sensibilidad del patógeno por efecto de los distintos fungicidas al que fue sometido. También se explica en parte el efecto del fungicida con tres ingredientes activos sobre la intensidad de la MB, esto es de utilidad para futuras investigaciones que intente generar y/o optimizar opciones para el control *B. sorokiniana*. Es importante destacar que estos resultados se obtuvieron a partir de experimentos realizados en condiciones controladas de invernáculo.

#### **4.4 Implicancias para futuras investigaciones**

Los resultados obtenidos permiten proponer algunas líneas de investigación futuras que podrían complementar el trabajo iniciado en esta tesis como por ejemplo la pérdida de eficiencia de los fungicidas a través del monitoreo de la sensibilidad o determinar el surgimiento de aislados resistentes.

Mediante la implementación de la metodología utilizada en el capítulo II, se podría posicionar estratégicamente algún producto al mercado, promocionando así la rotación de ingredientes activos para tratar de evitar la resistencia cruzada.

Se podría proponer complementar los ensayos *in vivo* e *in vitro* con otras alternativas al momento de monitorear la sensibilidad, por ejemplo, utilizando técnicas basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction), las cuales son más sensibles y generalmente requieren menor tiempo para realizarse. Entre otras opciones se destacan, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Konieczny y Ausubel, 1993), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) (Oefner y Underhill, 1995), PIRA-PCR (Primer-Introduced Restriction Enzyme Analyses) (Vuorio *et al.*, 1999), PCR de alelos específicos (Delye *et al.*, 1997) y detección de repeticiones en tandem de potenciadores transcripcionales de los promotores de los genes objetivo (Hamamoto *et al.*, 2001). Adicionalmente, se han diseñado métodos que permiten detectar cuantitativamente los niveles de resistencia en las poblaciones mediante PCR en tiempo real (Gisi *et al.*, 2002).

En este trabajo se obtuvieron 19 aislados locales de *B. sorokiniana*, dichos aislados se encuentran preservados en el laboratorio de Fitopatología-FAUBA. Sería conveniente ampliar la colección con representantes de otras zonas productoras de cebada. Eventualmente también se podría complementar la colección con aislados de *B. sorokiniana* obtenidos a partir de muestras de trigo y otros cereales. Esto permitirá realizar comparaciones entre poblaciones ya sea con aislados locales como de otros países.

También se podrían encaminar futuros trabajos de caracterización molecular de la variabilidad genética para verificar la presencia de mutaciones que podrían conferir resistencia a los diferentes fungicidas, en caso de detectar pérdida de sensibilidad.

Si bien se comprobó la efectividad de todos los fungicidas que normalmente usan los productores a campo, sería interesante estudiar complementariamente la sensibilidad también con principios técnicos puros, esto a fin de estimar el valor de  $CI_{50}$  de cada ingrediente activo para el patógeno.

El medio de cultivo natural (APG) utilizado en los ensayos *in vitro* de esta tesis resultó eficiente, si bien se probaron varios medios de cultivo, entre ellos nutritivos y sintéticos, fue en este medio donde el patógeno expreso en forma rápida y sostenida el crecimiento micelial (Dominguez *et al.*, 2017). En trabajos de sensibilidad de hongos a fungicidas es importante conducir los ensayos con un medio que resulte en el máximo crecimiento del

micelio de los hongos en estudio, por ellos se recomienda su utilización para posteriores ensayos.

A campo, sería conveniente evaluar el efecto de las mezclas con carboxamida sobre las mismas variables evaluados en esta tesis, esto puede complementarse evaluando un mayor número de aplicaciones, distintos momentos de aplicaciones y distintas dosis. Igualmente sería interesante repetir este ensayo en distintas condiciones ambientales para ver como esto repercute sobre la sensibilidad de los aislados. Una última etapa sería realizar pruebas de eficacia en diferentes lugares de producción de cebada-trigo para observar el efecto del fungicida en lugares donde la presión de selección es natural.

## **Capítulo V:**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Aba-Fuentes, A.; Ceballos-Alcantarilla, E.; Mercader, J. V.; Angulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Esteve-Turrillas, F. A. 2015. Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, v. 407, n. 14 p. 4207-4211.
- Acharya, K.; Dutta, A. K.; Pradhan, P. 2011. '*Bipolaris sorokiniana*' (Sacc.) Shoem: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Australian Journal of Crop Science* 5, 1064–71.
- Adhikary, S. K. 2000. Study on the variability in isolates of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of wheat. Ph. D. Thesis. Department of Plant Pathology, BSMRAU, Gazipur, Bangladesh.
- Agostinetto, L.; Casa, R. T.; Bogo, A.; Sachs, C.; Souza, C. A.; Reis, E. M.; Cunha, I. C. 2017. Barley spot blotch intensity, damage, and control response to foliar fungicide application in southern Brazil. *Crop Protection* 67: 7-12.
- Ahmed, A. U.; Rahman, M. Z.; Bhuiyan, K. A.; Mian, I. H. 1997. Variation in isolates of *Bipolaris sorokiniana* from wheat. *Bangladesh Journal of Plant Pathology* 13: 29-36 p.
- Ahmed, F. 2001. Studies on pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* and its effect on grain filling of wheat in Bangladesh. Ph. D. Thesis. Department of Plant Pathology, BAU. Mymensingh.
- Ajigboye, O. O.; Murchie, E.; Ray, R.V. 2014. Foliar application of isopyrazam and epoxiconazole improves photosystem II efficiency, biomass and yield in winter wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114: 52-60.
- Alam, B. K.; Banu, S. P.; Shaheed, M. A. 1997. The occurrence and significance of spot blotch in Bangladesh. In: *Proceedings of the International Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico, and February 9–14*, 63- 66.
- Alcorn, J.L. 1988. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. *Annual Review of Phytopathology* 26: 37–56.



- American Phytopathological Society. 1947. Committee of Standardization of Fungicidal Tests. Test tube dilution technique for use with the slide-germination method of evaluating protective fungicides. *Phytopathology*, v. 37, 354-356 p.
- Aminuzzaman, F. M.; Hossain, I. 2005. Pathotype variation on *Bipolaris sorokiniana* on wheat. *Bangladesh J. of Plant Pathology* vol. 21.
- Aminuzzaman, F. M.; Hossain, I.; Ahmed, F. 2010. Cultural Variation and Pathogenicity of *Bipolaris Sorokiniana* on wheat in Bangladesh. *Int. J. Agric. Environment and biotechnology* 3(1): 207-216.
- Anderson, T. R.; Patrick, Z.A. 1980. Soil vampyrellid amoebae that cause small perforations in conidia of *Cochliobolus sativus*. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 159-167.
- Antoniazzi, N., Deschamps, C. 2007. *Bipolaris sorokiniana* control and grain yield in barley after application of elicitors and fungicide. *Acta Sci. Agron.* 29, 695-700.
- Arias, G. 1995. Mejoramiento genético y producción de cebada cervecera en América del Sur. Santiago, Chile: Dirección de producción y protección Vegetal (FAO), Oficina Regional de la FAO para América Latina y Caribe. 162 p.
- Arraiano, L. S.; Brading, P. A.; Brown, J. K. M. 2001. A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. *Plant Pathology*, v. 50, n. 3, 339-346 p.
- Balardin, R. S.; Silva, F. D. L.; Debona, D.; Corte, G. D.; Favera, D. D.; Tormen, N. R. 2011. Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas como redutores dos efeitos do estresse hídrico em plantas de soja. *Ciência Rural*, v.41, p.1120-1126.
- Baldanzi, G. 1988. As lavouras de inverno - 2: cevada, tremoço, linho, lentilha In: Baldanzi, G; Baier, A. C.; Floss, E. L.; Manara, W.; Manara, N. T. F.; Veiga, P.; Tarragó, M. F. S.(Coord.). Rio de Janeiro: Ed. Globo. 11-67 p.
- Barba, J. T. 2001. *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) em sementes de cevada: detecção, transmissão e controle. Tese de mestrado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF. 196 p.

- Barba, J. T.; Reis, E. M.; Forcelini, C. A. 2004. Efeito do substrato no morfologia de conídios de *Bipolaris sorokiniana* e da densidade de inóculo na intensidade da mancha marrom em cevada. Fitopatologia Brasileira, v. 29, n. 1, 5-10 p.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Bellido, L. L. 1991. Cultivos Herbáceos - Cereales. Madrid. v.1, 439 p.
- Berbee, M. L.; Pirseyedi, M.; Hubbard, S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens inferred from ITS and glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 91(6): 964–977.
- Berdugo, C. A.; Mahlein, A. K.; Steiner, U.; Dehne, H. W.; Oerke, E. C. 2012. Sensors and imaging techniques for the assessment of the delay of wheat senescence induced by fungicides. Functional PlantBiology, 40: 677–689.
- Bisen, P. S.; Channy, B. 1983. Some observations on the surfase of wheat leaves during the early stages of infection by *Helminthosporium sativum* (P.K.&B.). Journal of the Indian Botanical Society 62: 285-287.
- Bolsa de Comercio de Rosario. 2017. Campaña de granos 2017/18 se encamina a nuevo récord. N° de edición 1823. <http://www.bcr.com.ar/> (Consultado el 9 de julio de 2018).
- Boosalis, M. G. 1962. Precocious sporulation and longevity of conidia of *Helminthosporium sativum* in soil. Phytopathology 52: 1172-1177.
- Barros, B. C.; Castro, J. L.; Patrício, F. R. A. 2006. Response of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to the chemical control of fungal diseases. Summa Phytopathol. 32, 239-246.
- Bovill, J.; Lehmensiek, A.; Sutherland, M.W. et al. 2010. Mapping spot blotch resistance genes in four barley populations. Molecular Breeding 26: 653. doi: 10.1007/s11032-010-9401-9.
- Brent, K. J.; Hollomon, D. W. 1988. Fungicide resistance: the assessment of risk. Brussels.

- Cabrera, M. G.; Cúndom M. A.; Eloy, A. R.; Gutiérrez, A. G. 2010. Ocurrencia de *Bipolaris sorokiniana* en plantas de soja en Argentina. Summa phytopathologica. vol.36 no.2, 172-174 p. doi: 10.1590/S0100-54052010000200013
- Cano, J. L. M. 1989. Taxonomía, citología, origen filogenético. In: Cano, J. L. M. (Coord) La Cebada. Madrid: Mundi Prensa. 19-23 p.
- Carmona, M. A. 2001. Transmisión, epidemiología y control de *Drechslera teres* en semillas de cebada cervecera. Resumen de tesis M Sc, M EPG. Rev. Facultad de Agronomía, 21 (2): 171.
- Carmona, M. A. 2008. Manual para la identificación y manejo de las enfermedades del cultivo de cebada. 32 p.
- Carmona, M.; Di Núbila, S. 2016. Herbario virtual de fitopatología de la FAUBA. <http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar> (Consultado en abril de 2017).
- Carmona, M. A.; Sautua, F. 2016. Manejo químico de las enfermedades del cultivo de cebada cervecera en Argentina. In: Enfermedades de cebada en Argentina: Diagnóstico y Manejo. 1ra ed. Tres Arroyos: Centro Regional de Ingenieros Agrónomos de Tres Arroyos. 128 p.
- Carmona, M. A.; Sautua, F. 2015. Manual práctico para el diagnóstico de enfermedades foliares y su control con fungicidas en los cultivos de trigo y cebada. 84 p.
- Carmona, M.; Sautua, F. 2017. La problemática de la Resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. Agronomía & Ambiente Rev. Facultad de Agronomía UBA 37(1): 1-19
- Carmona, M. A.; Abello, A.; Sautua, F. 2011. Resistencia de los hongos a los fungicidas. Guía de Productos Fitosanitarios, pp.161-168, CASAFE.
- Carmona, M. A.; Reis, E. M.; Cortese, P. 1999. Manchas foliares del trigo. Diagnóstico, epidemiología y nuevos criterios para el manejo. Buenos Aires, Argentina. 32 p.
- Carmona, M. A.; Sautua, F.; Reis, E. M. 2014b. Control de enfermedades fúngicas del trigo mediante fungicidas. En: Enfermedades del trigo: avances científicos en la

- Argentina. Cordo, C.; Sisterna, M. (Eds) Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (EDULP), La Plata Bs. As. 349-370 p. ISBN 9789871985357.
- Carmona, M. A.; Barreto, D.; Moschini, R.; Reis, E. M. 2008. Epidemiology and control of seed-borne *Drechslera teres* on barley. Cereal Research Communications 36(4): 637-645 p.
  - Carmona, M. A.; Scandiani, M. M.; Formento, A. N.; Luque, A. 2013. Epidemias de *Ramularia collo-cygni*, organismo causal del salpicado necrótico de la cebada. Pages 44-47 in: Campaña 2012-2013 Revista Cultivos Invernales en SD de Aapresid. Online publication. Cultivos Invernales, AAPRESID.
  - Carmona, M. A.; Sautua, F.; Scandiani, M.; Bello, R.; López, V.; Luque, A. 2017. *In vitro* sensitivity assessment for late season soybean pathogens to fungicide mixtures. Australasian Plant Dis. Notes 12:20. DOI: 10.1007/s13314-017-0244-7.
  - Carmona, M. A.; Reis, E. M.; Sautua, F. 2018. Chapter 5: "Fungi resistance to fungicides in field crops: a growing problem worldwide. 149-193 pp. In " Fungicides: Perspectives, Resistance Management and Risk Assessment. Editors: Nova Science Publishers Paula Pérez Rodríguez, Ph.D., Diego Soto-Gómez, and Inmaculada de la Calle, Ph.D. (Laboratory of Hydrology and Geochemistry of Strasbourg (LHyGeS), Université de Strasbourg, and Plant Biology and Soil Science Department, University of Vigo, and others) ISBN 978-1-53613-308-0
  - Carlson, H.; Nilsson, P.; Jansson, H. B. Odham, G. 1991. Characterization and determination of prehelminthosporol, a toxin from the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*, using liquid chromatography/ mass spectrometry. J. Microbial Meth. 13, 259–269.
  - Carson, M. L. 1998. Aggressiveness and perennation of isolates of *Cochliobolus heterostrophus* from North Carolina. Plant Disease 82: 1043–1047.
  - Cattaneo, M. 2019. Cebada argentina: producción y destino. <http://cebadacervecera.com.ar/> (consultado en junio de 2019).
  - Chakraborty, S.; Old, K. M. 1982. Mycophagous soil amoeba: interactions with three plant pathogenic fungi. Soil Biology & Biochemistry 14: 247-255.

- Chand, R.; Pandey, S. P.; Singh H. V.; Kumar, S.; Joshi, A.K. 2003. Variability and its probable cause in natural populations of spot blotch pathogen (*Bipolaris sorokiniana*) of wheat (*T. aestivum* L.) in India. Journal of Plant Diseases and Protection 110:27-35.
- Chinn, S. H. 1976. *Cochliobolus sativus* conidia populations in soils following various cereal crops. Phytopathology 66: 1082-1084.
- Chinn, S. H.; Tinline, R. D. 1964. Inherent germinability and survival of spores of *Cochliobolus sativus*. Phytopathology 54: 349-352.
- Chinn, S. H. F.; Ledingham, R. J. 1958. Applications of a new laboratory method for the determination of the survival of *Helminthosporium sativum* spores in the soil. Canadian Journal of Botany 36: 289-295.
- Comissão de pesquisa de cevada. Indicações técnicas para produção de cevada cervejeira: safras 2001 e 2002. Passo Fundo. Embrapa Trigo. 2001
- Cook, R. T. A. 1989. Control of *Glomerella cingulata* f.sp. *camelliae* with fungicides. Plant Pathology, v. 38, n. 4, 514-519 p.
- Cortese, F. 2018. Panorama actual de cebada. Jornada de capacitación en cereales de invierno organizada por FMC. Tandil.
- Cunha, G. R.; Trombini, M. F. 1999. Trigo no Mercosul. Embrapa.
- Daniels, J.; Latin, R. 2013. Residual efficacy of fungicides for controlling brown patch on creeping bentgrass fairways. Plant Disease, 97: 1620-1625.
- De Waard, M. A.; Andrade, A. C.; Hayashi, K.; Schoonbeek, H. L.; Stergiopoulos, L.; Zwiers, L. H. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Pest Manag. Sci. 62, 195-207.
- Debnath, M. K. 1997. Occurrence of chromogenic variant in *Bipolaris sorokiniana*. M. S. Thesis. Dept. of Plant Path. BAU, Mymensingh.
- Delye, C.; Laigret, F.; Corio-Costet, M. F. 1997. A mutation in the 14-alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. Applied and Environmental Microbiology 63(8): 2966-2970.

- Diehl, J. A. 1980. Podridão comum de raízes. Danos elevados à cultura do trigo. Agroquímica CIBA-GEIGY 14: 4-7. 59.
- Diehl, J. A. 1982. Doenças de raízes de trigo. Circular Técnica no 3. Passo Fundo, RS. Embrapa-CNPT. 15 p.
- Diehl, J. A. 1983. Reação de gramíneas a podridão comum de raízes causadas por *Cochliobolus sativus*. Fitopatologia Brasileira. 8: 9-12.
- Di Rienzo J. A.; Casanoves, F.; Balzarini M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dimmock, J. P.; Gooding, M. J. 2002. The effects of fungicide on rate and duration of grain filling in winter wheat in relation to maintenance of flag leaf green area. Journal of Agricultural Science, 138: 1-16.
- Dominguez, J. A.; Grabowski, C. J. 2017. Transmisión y sensibilidad a fungicidas de *Stenocarpella maydis* y *Colletotrichum graminicola* en maíz (*Zea maydis* L.). Tecnol. Agrar. 2(1): 29-35.
- Dominguez, J. A.; Mejia, C.; Sisterna, M.; Sautua, F.; Carmona, M. A. 2017. Evaluación de medios de cultivos en el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* y *Drechslera teres*. Revista Mexicana de Fitopatología, v. 35, 86-87 p.
- Du, Y.; Ruan, H.; Shi, N.; Gan, L.; Yang, X.; Chen F. 2017. Sensitivity of *Bipolaris maydis* in Fujian to tebuconazole, pyraclostrobin and meptyldinocap Journal of Northwest A y F University - Natural Science Edition 45 (8) Yangling: Northwest A y F University (Natural Science Edition), 69-75.
- Duczek, L. J. 1981. Number and viability of conidia of *Cochliobolus sativus* in soil profiles in summerfallow fields in Saskatchewan. Canadian Journal of Plant Pathology 3: 12-14.
- Durytnina, E. P.; Chicheva, T. B.; Alekseeva, N. P. 1980. Survival of conidia de *Helminthosporium sativum* in soil in relation to its physico-chemical properties and mineral fertilizers introduced. Biologicheskie Nauki 11: 90-95.

- Duveiller, E.; Gilchrist, L. I. 1994. Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: current situation and future prospects. Proceedings of the CIMMYT/UNDP workshop, Nashipur (Dinajpur), Bangladesh, February. 343–345.
- Edgington, L. V.; Khew, K. L.; Barrow G. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61:42- 44.
- Eckhardt, H., Steubing, L., Kranz, J. 1984. Das Koloniewachstum von *Erysiphe graminis* D. C. f.sp. *hordei* Marchal in Abhängigkeit von Temperatur and Insertionshöhe der Blätter. *Angewandte Botanik* 58:433-443.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Português (EMBRAPA Trigo). 2010. Cultura do trigo. <https://www.embrapa.br/trigo> (Consultado el 17 mayo de 2017).
- Entz, M. H.; Van Den Berg, C. G. J.; Lafond, G. P.; Stobbe, E. H.; Rossnagel, B. G.; Austenson, H. M. 1999. Effect of late-season Fungicide application on grain yield and seed size distribution in wheat and barley. *Can. J. Plant Sci.* 70, 699e706
- Errequerena, I. 2018. Enfermedades de cereales de invierno Salpicado necrótico en cebada y Roya amarilla Reconocimiento, evaluación/cuantificación y criterios de manejo. 55 p.
- Erreguerena, I.; Quiroz, F. J. 2016. Impacto de las enfermedades foliares sobre la producción de la cebada: tácticas de protección, criterios de aplicación, estrategias anti resistencia. 6 p.
- Farias, C. R.; Del Ponte, E. M.; Lucca Filho, A. O.; Pierobon, C. R. 2005. Fungos causadores de helmintosporiose associados as sementes de aveia-preta (*Avena strigosa*, Schreb). *R Bras Agrociencia* 11:57–61.
- Farr, D. F.; Rossman, A. Y. 2013. Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory. ARS, USDA.
- Feksa, H. R.; Duhatschek, B. 2005. Manejo da complexo de doenças na cultivar de cevada BRS 195, Entre Rios – Guarapuava, PR - 2004. *In: Reunião Anual De Pesquisa De Cevada*, 25. Guarapuava. Anais. Guarapuava: FAPA, 2005. p. 385-390

- Fernandez, M. R.; Fernandes, J. M. C. 1990. Survival of wheat pathogens in wheat and soybean residues under conservation tillage systems in southern and central Brazil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12: 289-294.
- Fernandez, M. R.; Fernandes, J. M.; Sutton, J. C. 1993. Effects of fallow and of summer and winter crops on survival of wheat pathogens in crop residues. *Plant Disease* 77: 698-703.
- Fetch, T. G.; Steffenson, B. J. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease*, 83: 213 – 217.
- Fleitas, M. C. 2017. Tolerancia de cultivares de trigo a mancha amarilla y roya de la hoja: su impacto en el rendimiento y calidad panadera bajo fertilización nitrogenada y aplicación de fungicidas sistémicos. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional De La Plata, 152 p.
- Fradkin, A.; Patrick, Z. A. 1985. Effect of matric potential, pH, temperature, and clay minerals on bacterial colonization of conidia of *Cochliobolus sativus* and on their survival in soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 19-27.
- Francis, R. G., Burgess, L. W. 1975. Surveys of Fusaria and other fungi associated with stalk rot of maize in Eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 26: 801-807. 1975.
- Franckowiak, J.; Sturgess, J.; Platz, G. 2014. Barley – planting and disease guide (Queensland and NSW). State of Queensland. 10 p.
- Frezzi, M. J. 1978. Podredumbre de la raíz y podredumbre basal del tallo (vuelco) del sorgo, en la provincia de Córdoba, Argentina. *IDIA* 334/336: 23-41.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2012. List of plant pathogenic organism resistant to disease control agents. <http://www.frac.info/frac/index.htm> (Consultado el mayo de 2017).
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2018. Code List: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering).
- Gayad, S. K. 1961. Production of symptoms of barley leaf spot disease by cultural filtrates of *Helminthosporium sativum*. *Nature*, 191, 725–726.



- Genet, J. L.; Steva, H.; Vincent, O.; Cazenave, C. 1997. A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. EPPO Bulletin, v. 27, n. 2-3, 217-225 p.
- Georgopoulos, S. G. 1982. Detection and measurement of fungicide resistance. In: Dekker, J.; Georgopoulos, S. G. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 24-31 p.
- Ghazvini, H.; Tekauz, A. 2007. Virulence Diversity in the Population of *Bipolaris sorokiniana*. Plant Disease 91(7): 814-821. doi: 10.1094/PDIS-91-7-0814
- Ghini, R.; Kimati, H. 2000. Resistência de Fungos a Fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78 p.
- Ghurde, V.R. 1966. Saprophytic ability of species of *Helminthosporium*. Transaction British Mycological Society 49: 241-243.
- Gisi, U., Sierotzki, H.; Cook, A.; McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. Pest Management Science 58(9): 859-867
- Gupta, P. K.; Chand, R.; Vasistha, N. K.; Pandey, S. P.; Kumar, U.; Mishra, V. K. 2018. Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding Plant Pathol. 67, 508–531. doi: 10.1111/ppa.12781
- Hamamoto, H.; Hasegawa, K.; Nakaune, R.; Jin-Lee, J.; Akutsu, K.; Hibi, T. 2001. PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. Pest Management Science 57(9): 839-843.
- Han, X.; Zhao, H.; Ren, W.; Lv, C.; Chen, C. 2017. Resistance risk assessment for fludioxonil in *Bipolaris maydis*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 139: 32–39 p.
- Havis, N. D.; Gorniak, K.; Carmona, M. A.; Formento, A. N.; Luque, A. G.; Scandiani, M. M. 2014a. First molecular detection of Ramularia leafspot (*Ramularia collo-cygni*) in seeds and leaves of barley in Argentina. Plant Dis. 98:277. DOI: 10.1094/PDIS-04-13-0416-PDN

- Herbario Virtual. Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. <http://herbariofitopatologia.agro.ubar.ar> (Consultado de julio de 2017)
- Hetzler, J.; Eyal, J.; Fehrmann, H.; Mehta, Y. R.; Kushnir, U.; Zekaria-Oren, J.; Cohen, L. 1991. Interaction between *Cochliobolus sativus* and wheat cultivars. In: Wheat for the non-traditional warmer áreas (Saunders, D.A., ed.). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT. 266–283 p.
- Hewitt, H. 1998. Fungicides in crop protection. Chapter 4. Fungicide performance. Englad, CABI. 87-153 p.
- Holmes, S. J. I.; Channon, A. G. 1984. Studies on metalaxyl-resistant *Phytophthora infestans* in potato crops in south-west Scotland. Plant Pathology, v. 33, n. 3, 347-354 p.
- Ibarguren L. 2014. Cátedra de Agricultura Especial. <http://campus.fca.uncu.edu.ar/> (Consultado en abril de 2016).
- Iftikhar, S.; Shahzad, A.; Munir, A.; Ahmed, I. 2009. Chracterization of *Bipolaris sorokiniana* isolated from different Agro-Ecological zones of wheat production in Pakistan. Pak. J. Bot. 41(1): 301-308.
- Jaiswal, S. K.; Sweta, S.; Prasad, L. C.; Sharma, S.; Kumar, S.; Prasad, R.; Pandey, S.P.; Chand, R. Joshi, A.K. 2007. Identification of molecular marker and aggressiveness for different groups of *Bipolaris sorokiniana* isolates causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). Current Microbiology 55:135-141.
- James, W. C. 1974. Assesment of plant deseases and losses. Ann.Rev. Phytopath 12:27-48.
- Jeger, M. J. 2004. Analysis of disease progress as a basis for evaluating disease management practices. Annual Review of Phytopathology 42:61-82.
- Johnston, R. 1997. Black point (kernel bligth). In: Mathre, D.E. (Ed.). Compendium of barley diseases. St. Paul, Minnesota. APS Press. 54-55 p.
- Jørgensen J. 1983. Disease testing of barley seed and application of test results in Denmark. Seed Sci. and Technol. 11: 615-624.

- Kachlicki, P. 1995. Metabolites of *Helminthosporia*. In: *Helminthosporia*. Metabolites, Biology, Plant Diseases: *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum* (Chelkowski J., ed.). Poznan, Poland: Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Science, pp. 1–26.
- Khan, A. R.; Khanam, N. A.; Ashrafuzzaman, M. 1992. Primary stage of infection of *Drechslera sorokiniana* on wheat. *Bangladesh Journal of Agricultural Sciences*. 19: 135-139.
- Khatskevich, L. K.; Benken, A. A. 1987. Role of agroecological factors in limiting soil infection by wheat root rot. In: Anônimo. Ecological aspects of harmfulness of cereal crops diseases. Leningrado, URSS. All Union Research Institute of Plant Protection. 27-34 p.
- Kiehr, M.; Wehrhahne, L.; Daddario, J.; Storm, A.; Delhey, R. 2016. El cultivo, el patógenos y la enfermedad. In: *Enfermedades de cebada en Argentina: Diagnóstico y Manejo*. 1ra ed. Tres Arroyos: Centro Regional de Ingenieros Agrónomos de Tres Arroyos. 128 p.
- Kodama, F.; Tsuchiya, S.; Iwata, T.; Igarashi, F.; Sawasaki, A. 1979. *Helminthosporium* spot blotch of rice caused by *Helminthosporium sativum* P. K. y B. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 45: 503-506.
- Konieczny, A.; Ausubel, F. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal* 4(2): 403-410.
- Kumar, J.; Schafer, P.; Hükelhoven, R.; Lungen, G.; Baltruschat, H.; Stain, E.; Nagarajan, S.; Kogel, K. H. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3(4):185-195.
- Kumar, J.; Hükelhoven, R.; Beckhove, U.; Nagarajan, S. R.; Kogel, K. 2002b. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology*. 91:127-133.

- Kumar, P.; Anshu, V.; Kumar, S. 2011. Morpho-pathological and molecular characterization of *Bipolaris oryzae* in rice (*Oryza sativa*). Journal of Phytopathology 159:51-56.
- Kunhem Junior, P. R.; Casa, R. T.; Rizzi, F. P.; Moreira, E. D.; Bogo, A. 2009. Fungicides performance to control wheat leaf diseases. Rev. Cien. Agrov. 8, 35e42.
- Lacicowa, B.; Machowicz, Z. 1974. Investigations on the pathogenicity of *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. in relation to *Phaseolus vulgaris*. Acta Mycologica 10: 283-293.
- Lacicowa, B.; Pieta, D. 1994. The effect of recurrent cropping on stem and root diseases and grain yield of spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Roczniki Nauk Rolniczych 23: 21-25.
- Lacicowa, B.; Pieta, D.; Kiecana, I.; Kukielka, R. 1993. Protective effect of chemical dressing in naturally infested soil with fungi causing root and stem rot of spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Materialy Sesji Instytutu Ochrony Roslin 33: 195-201.
- Larenz, C. R.; Hosford, R. M. Jr.; Freeman, T. P. 1986. Infections of wheat and oats by *Pyrenophora tritici repentis* and initial characterization of resistance. Phytopathology 76: 931-938.
- Liljeroth, E., Franzon-Almgren, I.; Gunnarsson, T. 1993. Effect of pre-helminthosporol, a phytotoxin produced by *Bipolaris sorokiniana*, on barley roots. Can. J. Bot. 72, 558–563.
- Leng, Y.; Zhong, S. 2015. The Role of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Signaling Components in the Fungal Development, Stress Response and Virulence of the Fungal Cereal Pathogen *Bipolaris sorokiniana*. PLoS ONE 10(5): e0128291. doi: 10.1371/journal.pone.0128291
- Leonard, K. J.; Thakur, R. P.; Leath, S. 1988. Incidence of *Bipolaris* and *Exserohilum* species in corn leaves in North Carolina. Plant Disease 72: 1034-1038.
- Lev, S.; Sharon, A.; Hadar, R. 1999. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium

formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogenactivated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 96: 13542–13547.

- Ludwig, R.A. (1957) Toxin production by *Helminthosporium sativum* P. K. y B. and its significance in disease development. *Can. J. Bot.* 35, 291–303.
- Lutey, R. W.; Christensen, C. M. 1963. Influence of moisture content temperature and length of storage upon survival of fungi in barley kernels. *Phytopathology* 53: 713-717.
- Luz, W. C. da; Linhares, A. G. 1983. Tratamento de sementes de cevada com fungicidas. *Fitopatologia Brasileira* 8: 415-423.
- Machacek, J. E.; Wallace, A. H. 1952. Longevity of some common fungi in cereal seed. *Canadian Journal of Botany* 30: 164-169.
- Machado, J. da C. 1982. Controle de fitopatógenos associados a sementes. *Informe Agropecuário* 8: 35-38.
- Manamgoda, D. S.; Cai, L.; Bahkali. A. H. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity* 51: 3–42.
- Manamgoda, D. S.; Rossman, A. Y.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W.; Madrid, H.; Chukenirote, E.; Hyde, K. D. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 79, 221–288. <http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Marathe, H.; Zinno, T. D.; Longree, H.; Daumerie, V. Duveiller, E. 1998. Fungi association with foliar blight of wheat areas. In: *Helminthosporium* blights of wheat: Spot blotch and Tan spot (Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A, eds.) Mexico. D.F., Mexico: CIMMYT. 293-300 p.
- Mathre, D. E. 1982. *Compendium of Barley Diseases*. 2.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society. 78 p.
- Mathre, D. E. 1997. *Compendium of barley diseases*. American Phytopathological Society. pp. 120 pp.

- Mathur, S. B.; Kongsdal, Q. 2000. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing countries, Denmark. p.164.
- McDonald, M. C.; Ahren, D.; Simpfendorfer, S.; Milgate, A.; Solomon, P. S. 2018. The discovery of the virulence gene ToxA in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Molecular Plant Pathology 19(2): 432-439. doi: 10.1111/mpp.12535
- Mehta, Y. R. 1978. Doenças do trigo e seu controle. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres Ltda. 190 p.
- Mehta, Y. R. 1981. Produção de conídios, período de esporulação e extensão da lesão por *Helminthosporium sativum* nas folhas bandeira de trigo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 16: 77-99.
- Mensah, R. A.; Zwatz, B. G. 1975. A study on stalk rot of maize (*Zea mays* L.), the disease complex with special reference to possibilities of artificial inoculation. Pflanzenschutzberichte 44: 161-194.
- Menten, J.O. 1996. Tratamento de sementes. In Soave, J.; Oliveira, M. R.; Menten, J. O. (Ed.). Tratamento químico de sementes. Anais, 4to Simpósio Brasileiro.
- Meronuck, R. A.; Pepper, E. H. 1968. Chlamydospore formation in conidia of *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 58: 866-867.
- Miller, T. C.; Gubler, W. D. 2004. Sensitivity of California isolates of *Uncinula necator* to Trifloxystrobin and spiroxamine, and uAPGte on triadimefon sensitivity. Plant Disease, v. 88, n. 11, 1205-1212 p.
- Misra, A. P. 1981. Variability, physiological specialization and genetics of pathogenicity in *graminicolus Helminthosporium* affecting cereal crops. Indian Phytopathology 34:1-22.
- Muchovej, R.; Muchovej, M. C.; Ribeiro-Nesio, M. L. 1988. Taxonomia de Drechslera, Bipolaris e Exserohilum. Fitopatologia Brasileira 13: 211-223.
- Mundstock, C. M. 1983. Cultivo de cereais de estação fria: trigo, cevada, aveia, centeio, alpeste, triticale. Porto Alegre. 165 p.

- Nelson, R. R. 1960. Evolution of sexuality and pathogenicity. I. Interspecific crosses in the genus *Helminthosporium*. *Phytopathology* 50:357–377.
- Nerbass Junior, J. M.; Casa, R. T.; Gava, F.; Bogo, A.; Kunhem Junior, P. R.; Bolzan, J.M. 2008. White oat leaf diseases control and production damages in response to the rate and number of fungicide applications. *Rev. Cien. Agrov.* 7, 127-134.
- Nojosa, G. B.; Resende, M. L. V.; Resende, A. 2005. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: Cavalcanti, L. S.; DI Piero, R. M.; Cia, P.; Pascholati, S. F.; Resende M. L.V. y Romeiro, R. S. (Ed.). *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos*. FEALQ, Piracicaba, SP, 263 p.
- Nowicki, B. 1995. The fungi causing damping-off of carrot seedlings. *Acta Agrobotanica* 48: 43-48.
- Nowicki, B. 1997. Etiology of root parsley damping-off. *Acta Agrobotanica* 50: 35-40.
- Noyd, R. K. 2000. *Mycology reference cards*. St. Paul, Minnesota. APS Press.
- Oefner, P. J.; Underhill, P. A. 1995. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *American Journal Human Genetics* 57(Supl.): A266
- Oga, S.; Camargo, M. A.; Batistuzzo, J. A. 2008. *Fundamentos de toxicología*. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora.
- Old, K. M. 1967. Effects of natural soil on survival of *Cochliobolus sativus*. *Transactions British Mycological Society* 50: 615-624.
- Old, K. M.; Robertson, W. R. 1970. Effects of lytic enzymes and natural soil on the fine structure of conidia of *Cochliobolus sativus*. *Transactions British Mycological Society* 54: 343-350.
- Oliveira, A. M.; Matsumura, A. T.; Prestes, A. M.; Matos, G. S.; Van Der Sand, S. T. 1998. Variabilidade patogénica e morfológica em isolados de *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatol Bras* 23:349-353.
- Ou, S. H. 1985. *Rice diseases*, 2nd edn. CAB International, UK.

- Oxley, S. 2004. Barley disease control. Technical note 558. Scottish Agricultural College, Edinburgh.
- Oxley, S. Hunter, E. A. 2005. Appropriate fungicide doses on winter barley: producing dose-response data for a decision guide. HGCA Project Report No 366.
- Pandey, S. P.; Kumar, S.; Kumar, U.; Chand, R. Joshi, A. K. 2005. Sources of inoculum and reappearance of spot blotch of wheat in rice–wheat cropping. *European Journal of Plant Pathology* 111(1): 47-55.
- Pandey, S. P.; Sharma, S.; Chand, R.; Shahi, P.; Joshi, A. K. 2007. Clonal variability and its relevance in generation of new pathotypes in the spot blotch pathogen, *Bipolaris sorokiniana*. *Curr Microbiol* 56:33–41.
- Parker, J. E.; Warrilow, A. G. S.; Cools, H. J.; Martel, C. M.; Nes, W. D.; Fraaije, B. A.; Lucas, J. A.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. 2011. Prothioconazole binds to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 by a different mechanism compared to other azole antifungals. *Appl Environ Microbiol*.77: 1460–1465.
- Parker, J. E.; Warrilow, A. G.; Cools, H. J.; Fraaije, B. A.; Lucas, J. A.; Rigdova, K.; Griflths, W. J.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. 2013. Prothioconazole and prothioconazole-desthio activities against *Candida albicans* sterol 14-a-demethylase. *Appl Environ Microbiol*.79: 1639–1645.
- Pereyra, S. 1996. Enfermedades de cebada en Uruguay: reconocimiento, epidemiología y estrategia de manejar. In: Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Serie Técnica 74: 110-111. INIA, Uruguay.
- Picinini, E. C.; Fernandes, J. M. 1991. Doenças de Cevada. In: Doenças em cereais de inverno - Aspectos epidemiológicos e controle, Passo Fundo. 1 CD-ROM.
- Picinini, E. C.; Fernandes, J. M. 1999. Efeito de fungicidas no controle “*in vitro*” e “*in vivo*” de *Bipolaris sorokiniana* e de *Fusarium graminearum*. Anais, XIX Reunião Anual de Pesquisa de Cevada. Passo Fundo. Embrapa-Trigo. 418-422 p.
- Piening, L. 1997. Common root rot and seedling blight. In: Mathre, D. E. (Ed.). *Compendium of barley diseases*. St. Paul, Minnesota. APS Press. 10-13 p.



- Prates, L.G.; Fernandes, J. M. C. 2001. Avaliando a taxa de expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. Fitopatologia Brasileira 26: 185-191.
- R Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Ranzi, C. Forcelini C. A. Deuner, C. C. 2015. Efeito de temperaturas na expansão, número de lesões e severidade da mancha-amarela da folha do trigo. Summa Phytopathologica 41(4):311-314.
- Rahman, M. 2011. Physiological, cultural and morphological variation of *Bipolaris sorokiniana*. Master of Science in plant pathology. Dhaka, Bangladesh. 50 p.
- Rashid, A. Q.; Fakir, G. A.; Hossain, I.; Kulshrestha, D. D. 1997. Association of *Bipolaris sorokiniana* with wheat seeds and its transmission from seed to plant. Bangladesh Journal of Plant Pathology 13: 17-20.
- Rashid, A.Q. 1988. Effect of seed transmitted *Bipolaris sorokiniana* on the growth and survival of wheat seedlings. Indian Phytopathology. 51: 329-333.
- Reis, E. M. 1981. Podridão de raízes seminais e lesões foliares do trigo (*Triticum aestivum* L.) associadas a *Helminthosporium sativum* Pamm., King & Bakke, transmitido pela semente. Summa Phytopathologica 7: 39-44.
- Reis, E.M. 1982b. Levantamento de plantas cultivadas, nativas e invasoras, hospedeiras de fungos causadores de podridões radiculares em cereais de inverno e em outros cultivos. Summa Phytopathologica 8: 134-140.
- Reis, E. M. 1984. Disseminação anemófila de propágulos de *Helminthosporium sativum* e sua contribuição na densidade de inóculo no solo. Fitopatologia Brasileira 9: 109-112.
- Reis, E. M. 1987. Patologia de sementes de cereais de inverno. São Paulo, SP. CNDA. 32 p.
- Reis, E. M. 1988a. Doença do trigo III: podridão comum de raízes – helmintosporiose. São Paulo, SP. CNDA. 20 p.

- Reis, E. M. 1989. Longevity of *Cochliobolus sativus* propagules in soil. Fitopatologia Brasileira 14: 205-207.
- Reis, E.M. 1994. Manual de identificação e de quantificação de doenças de trigo. Passo Fundo, RS. Agroalpha. 59 p.
- Reis, E. M.; Abrão, J. J. 1983. Effect of tillage and wheat residue management on the vertical distribution and inoculum density of *Cochliobolus sativus* in soil. Plant Disease 67: 1088-1089.
- Reis, E. M.; Baier, A. C. 1983. Reação de cereais de inverno à podridão comum de raízes. Fitopatologia Brasileira 8: 277-281.
- Reis, E. M.; Santos, H. P dos. 1985. População de *Helminthosporium sativum* no ar quantificada através de uma armadilha tipo catavento. Fitopatologia Brasileira 10: 515-519.
- Reis, E. M.; Santos, H. P dos. 1987. The increased sporulation of *Cochliobolus sativus* on above-ground tissues of small grains and its relationship to the origin of inoculum in the soil. Fitopatologia Brasileira 12: 106-208.
- Reis, E. M.; Medeiros, C. A. 1995. Control de enfermedades de plantas por rotación de cultivos. In: Kohli, M. M.; Annone, J. G.; García, R. (Ed.). Curso de manejo de enfermedades del trigo. Las enfermedades del trigo en el Cono Sur. Pergamino, Argentina. 53-67 p.
- Reis, E. M.; Carmona, M. A. 2013. Classification of fungicides. In: Fungicides: Classification. Role in Disease Management and Toxicity Effects. Editorial Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Site 1600 Hauppauge, NY 11788. 91-104 p.
- Reis, E. M.; Carmona, M. A. 2011. Sensibilidade de razas de *Puccinia triticina* a fungicidas. II SIMPOSIO NACIONAL DE AGRICULTURA, FAGRO - GTI Agricultura y IPNI Cono Sur, pp 89-94; 29 y 30 de setiembre de 2011 Paysandu, Uruguay Ed. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay- Hemisferio Sur ISBN 978-9974-0-0781-9

- Reis, E. M.; Argenta, J. A.; Velloso, J.A. 1985a. Multiplicação de *Helminthosporium* spp. em tecidos senescentes de gramíneas invasoras e soja, sob condições naturais. Fitopatologia Brasileira 10: 643-648.
- Reis, E. M.; Barreto, D.; Carmona, M. 1999. Patógenos de semillas de cereales de invierno 100 p. ISBN 987-43-0481-2.
- Reis, E. M.; Santos, H. P. dos; Pereira, L.R.; Denardin, J. L. 1985b. Propágulos de *Helminthosporium sativum* detectados em restos culturais de soja (*Glycine max*) e sua relação com anos de rotação e culturas de inverno. Fitopatologia Brasileira 10: 455-460.
- Reis, E. M.; Fernandes, J. M. C.; Picinini, E. C. 1988. Estratégias para o controle de doenças do trigo. Passo Fundo, RS. Embrapa-CNPT. 50 p.
- Reis, E. M.; Casa, R. T.; Medeiros, C. A. 2001. Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno. Londrina: E. S. Comunicação S/C Ltda, 94 p.
- Reis, E. M.; Forcelini, C. A. E.; Reis, A. C. 2007. Manual de fungicidas: guia para o controle de doenças de plantas. 5. ed. rev. e ampl. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo. 153 p.
- Reis, E. M.; Reis, A. C.; Carmona, M. A. 2010. Manual de fungicidas. Controle químico de doenças de plantas. Passo Fundo, Brasil: Universidade de Passo Fundo (ed).
- Reis, E. M.; Zanatta, T.; Anderson, L. 2014. Effect of the concentration of inoculum and tensoactive on the efficiency of *Bipolaris sorokiniana* infection in wheat leaves. Summa Phytopathologica, 40(2), 178-181.
- Reis, E. M.; Reis, A.; Carmona, M. A. 2016. Manual de fungicidas: guia para o controle químico racional de doenças de plantas. 7ª edicao 280 pp. Ed. Berchier, Passo Fundo ISBN 978-85-7912-240-8.
- Reis, E. M.; Santos, H. P. dos; Pereira, L. R.; Denardin, J. L. 1985b. Propágulos de *Helminthosporium sativum* detectados em restos culturais de soja (*Glycine max*) e sua relação com anos de rotação e culturas de inverno. Fitopatologia Brasileira 10: 455-460.

- Reis, E. M.; Reis, A. C.; Casa, R. T.; Blum, M. M. 1999. Comparison of methods to detect leaf head blighting fungi in small grain seeds. *Summa Phytopathologica* 25: 364-367.
- Reis, A.; Ribeiro, F. H. S.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G. 2005. Sensitivity of brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. *Plant Disease*, v. 89, n. 12, 1279-1284 p.
- Reis, E. M.; Zanatta, M.; Carmona, M.; Menten J. O. 2015. Relationship between IC50 determined *in vitro/in vivo* and the fungicide rate used in the field. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.1, pp. 49-53.
- Reuveni, M.; Siegel, M. R.; Nesmith, W. C. 1985. Bioassays using detached tobacco leaves to determine the sensitivity of *Peronospora tabacina* to fungicides. *Pesticide Science*, v. 16, n.3, 244-250 p.
- Roy, J.K.; Smith, K.P.; Muehlbauer, G.J. et al. 2010. Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Molecular Breeding* 26: 243. doi: 10.1007/s11032-010-9402-8.
- Russel, P. E. 2004. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph n° 3, Cambridge CB2 5AN, UK.
- Russell, R. C. 1958. Longevity studies with wheat seed and certain seed-borne fungi. *Canadian Journal Plant Science* 38: 29-33.
- SAGPyA 2019. Estimaciones agrícolas. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/> (consultado en junio de 2019).
- Scheffer, R. P. 1997. The nature of disease in plants. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Scott, D. B.; Van Nierkerk, H. A.; Paxton, T. G. 1992. Effect of propiconazole on necrotrophic fungi and yield of barley genotypes differing in susceptibility to *Rhynchosporium secalis*. *Crop Prot* 11: 243–247.
- Schäfer, P.; Hüchelhoven, R.; Kogel, K. H. 2004. The white barley mutant albostrians show a supersusceptible but symptom less interaction phenotype with the

- hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17, 366–73.
- Sharvelle, E. G. 1961. The nature and uses of modern fungicides. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 308 p.
  - Shoemaker, R. A. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from '*Helminosporium*'. *Canadian Journal of Botany*. 37(5):879-887.
  - Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. 2015. *Hordeum vulgare* var. *Vulgare*. Disponible en línea: <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/hordeum-vulgare-var-vulgare> (Consultado en de agosto del 2018).
  - Sivanesan, A. 1987. Graminicolous Species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exerohilum* and Their Teleomorphs, *Mycological Papers* N° 158, C.A.B., Internacional Mycological Institute, 1987. 261 p.
  - Smith, J.; Grimmer, M.; Waterhouse, S.; Paveley, N. 2013. Quantifying the non fungicidal effects of foliar applications of fluxapyroxad (Xemium) on stomatal conductance, water use efficiency and yield in winter wheat. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 78: 523-35.
  - Sooväli, P., Koppel, M., 2009. Efficacy of fungicide tebuconazole in barley varieties with different resistance level. *Agric. Food Sci.* 19, 34e42.
  - Srinivas, p.; Singh, T. P.; Singh, A.; Prabhakar, A. 2009. Intraspecific variations in Indian isolates of *Bipolaris sorokiniana* infecting wheat based on morphological, pathogenic and molecular characters. *Indian phytopathology* Vol 62, No 4 (2009).
  - Stefansson, T. S.; Hallsson, J. H. 2011. Analysis of the species diversity of leaf pathogens in Icelandic barley fields. *Icelandic Agricultural Sciences*, 24,13–23.
  - Stolte, R. E. 2006. Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas in vitro. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo - UPF. Passo Fundo - RS. <http://www.ppgagro.upf.br/download/roseanastolte.pdf>. (Consultado en abril del 2016).

- Sturz, A.V.; Bernier, C. C. 1987. Survival of cereal root pathogens in the stubble and soil of cereal versus noncereal crops. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 205-213.
- Tanaka, M. A. S.; Machado, J. da C. 1985. Patologia de sementes. *Informe Agropecuário* 11: 40-46.
- Tinline, R. D. 1988. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. In: Ingram, D. S. & Williams, P. H. (Ed.) *Advances in Plant Pathology. Genetics of Plant Pathogenic Fungi*. Vol. 6. California. Academic Press. 113-122 p.
- Tinline, R. D.; Ledingham, R. J. 1979. Yield losses in wheat and barley cultivars from common root rot in field tests. *Canadian Journal of Plant Science* 59: 313-320.
- Tomaso, J. C. 2008. Cebada Cervejera en Argentina. IDIAXXI Cultivos Industriales, INTA. <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210288.pdf>. (Consultado en julio de 2016).
- Tomerlin, J. R.; Howell, T. A. 1988. Distrain: a computer program for training people to estimate severity on cereal leaves. *Plant Disease* 72: 455-459.
- Turner, W. B. Aldridge, D. C. 1983. *Fungal Metabolites*. II. London: Academic Press.
- Ubbarao K. V. Michailides, T. J. 1995 Effects of temperature on isolates of *Fusarium moniliforme* causing fig endosepsis and *Aspergillus niger* causing smut. *Phytopathology* 85:662-668.
- Ullstrup, A. J. 1972. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970–1971. *Annual Reviews of Phytopathology* 10: 37–50.
- Valim-Labres, M. E.; Matsumura, A. T. S.; Porto, M. D. M. 1998. First report of chlamydospores on hypha of *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatologia Brasileira* 23: 410.
- Vechiato, M. H.; Lasca, C. C. & Valarini, P. J. 1987. Sobrevivência do fungo *Helminthosporium sativum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) armazenadas. *Fitopatologia Brasileira* 12: 226-231.

- Vuorio, A. F.; Paulin, L.; Saltevo, J.; Kontula, K. 1999. Single-nucleotide polymorphisms may cause erroneous results in primer-introduced restriction enzyme analyses: a case of molecular misdiagnosis of homozygous vs heterozygous familial hypercholesterolemia. *Molecular and Cellular Probes* 13(6): 421-424.
- Wiese, M. V. 1977. *Compendium of wheat diseases*. St. Paul, Minnesota. APS Press. 106 p.
- Wiese, M. V. 1987. *Compendium of Wheat Diseases*. St. Paul: The American Phytopathological Society, 112 p.
- Wong, F. P.; Wilcox, W. F. 2001. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and methalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). *Plant Disease* 85: 649-656.
- Wu, Y.X.; Von Tiedemann, A. 2001. Physiological effects of azoxystrobin and epoxiconazole on senescence and the oxidative status of wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71: 1-10.
- Zadoks, J. C.; Chang, T. T.; Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14: 415-421.
- Zambolim, L.; Venancio, W. S.; Oliveira, S. H. F. 2007. *Manejo da resistência de fungos a fungicidas*. Viçosa: UFV, DPF. 168 p.
- Zhang, L.; Zhang, J.; Wang, J.; Tan, G. 2001. Sensitivity of *Bipolaris maydis* to five fungicides in Anhui Province. (College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China) *Plant Protection*, Aug., v.37(4) 163-166 p.
- Zhang, N.; Rossman, A. Y.; Seifert, K. 2013. Impacts of the international code of nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) on the scientific names of plant pathogenic fungi. Online APSnet Feature.
- Zillinsky, F. J. 1984. *Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño*. CIMMYT. El Batán, México. 141 p.

## **APÉNDICE**



## 6. APÉNDICE

### 6.1 Composición de los fungicidas\*\* utilizados:

azoxistrobina ----- 20 g  
 cyproconazole ----- 8 g  
 inertes y coadyuvantes c.s.p ----- 100 cm<sup>3</sup>

\*\* marca comercial: Amistar Xtra (Syngenta)

isopirrazam ----- 12,5 g  
 azoxistrobina ----- 20 g  
 inertes y coadyuvantes c.s.p ----- 100 cm<sup>3</sup>

\*\* marca comercial: Reflect Xtra (Syngenta)

Protioconazole ----- 17,5 g  
 Trifloxistrobin ----- 15 g  
 coadyuvantes c.s.p ----- 100 ml

\*\* marca comercial: Cripton (Bayer)

protioconazole ----- 17,5 g  
 trifloxistrobin ----- 15 g  
 bixafen ----- 12,5 g  
 coadyuvantes c.s.p ----- 100 ml

\*\* marca comercial: Cripton Xpro (Bayer)

fluxapyroxad ----- 5 g  
 pyraclostrobina ----- 8,1 g  
 epoxiconazole ----- 5 g  
 coformulantes c.s.p ----- 100 ml

\*\* marca comercial: Orqueta Ultra (BASF)

### 6.1.1 Composición del sustrato\*\* utilizado:

Turba de musgo *Sphagnum* de fibras medias, perlita, compost de corteza, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes, fertilizantes.

#### 6.2.1.1 Propiedades físico-químicas:

M.O.....85-90%

C.E.....0,3 – 0,45 mmhos/cm (2:1) \*

pH.....5,2 – 5,8 corregido (2:1)\*

\*Sin tener en cuenta poros de aire

\*\*marca comercial: Growmix Multipro (Terrafertil)

## 6.2 Análisis estadístico

**Tabla 6.2** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de cada fungicida evaluado para la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de los aislados de *B. sorokiniana*.

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Fungicida	N	Medias	H	p
CI50 (µg/mL)	azoxistrobina + cyproconaz..	20		0.37	71.12
<0.0001					
CI50 (µg/mL)	Bixafen + Trifloxistrobin ..	20		0.11	
CI50 (µg/mL)	Fluxapyroxad + Piraclostro..	20		0.05	
CI50 (µg/mL)	isopirazam + azoxistrobina..	20		0.49	
CI50 (µg/mL)	trifloxystrobin + prothioc..	20		0.21	

Trat.	Medias	Ranks		
Fluxapyroxad + Piraclostro..	0.05	15.85	A	
Bixafen + Trifloxistrobin ..	0.11	30.40	A	
trifloxystrobin + prothioc..	0.21	54.20	B	
azoxistrobina + cyproconaz..	0.37	70.05	B	C
isopirazam + azoxistrobina..	0.49	82.00	C	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 6.3** Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de los valores medios de CI<sub>50</sub> de diez aislado de *B. sorokiniana* analizado para los cinco fungicidas testeados

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Aislado	N	Medias	Medianas	H	p
CI50 (µg/mL)	16B	5	0.20	0.21	4.71	0.8587
CI50 (µg/mL)	35B	5	0.20		0.18	
CI50 (µg/mL)	40B	5	0.26		0.29	
CI50 (µg/mL)	AB	5	0.21		0.16	
CI50 (µg/mL)	BB	5	0.20		0.17	
CI50 (µg/mL)	CB	5	0.18		0.12	
CI50 (µg/mL)	DB	5	0.44		0.32	
CI50 (µg/mL)	FB	5	0.24		0.15	
CI50 (µg/mL)	MB	5	0.24		0.18	
CI50 (µg/mL)	MO	5	0.31		0.23	

**Tabla 6.4** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de los valores de  $CI_{50}$  de aislado de *B. sorokiniana* analizado para el fungicida azoxistrobina (20%) + cyproconazole (8%)

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Aislado	N	Medias	Medianas	H	p
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	16B	2	0.27	0.27	9.23	0.4164
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	35B	2	0.18	0.18		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	40B	2	0.43	0.43		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	AB	2	0.48	0.48		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	BB	2	0.23	0.23		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	CB	2	0.31	0.31		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	DB	2	0.55	0.55		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	FB	2	0.45	0.45		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	MB	2	0.20	0.20		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	MO	2	0.61	0.61		

**Tabla 6.5** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de los valores de  $CI_{50}$  de aislado de *B. sorokiniana* analizado para el fungicida isopirazam (12,5%) + azoxistrobina (20%)

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Aislado	N	Medias	Medianas	H	p
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	16B	2	0.40	0.40	9.69	0.3765
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	35B	2	0.45	0.45		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	40B	2	0.37	0.37		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	AB	2	0.27	0.27		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	BB	2	0.43	0.43		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	CB	2	0.32	0.32		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	DB	2	1.00	1.00		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	FB	2	0.42	0.42		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	MB	2	0.68	0.68		
$CI_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	MO	2	0.52	0.52		

**Tabla 6.6** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de los valores de CI<sub>50</sub> de aislado de *B. sorokiniana* analizado para el fungicida trifloxystrobin (15%) + prothioconazole (17,5%)

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Aislado	N	Medias	Medianas	H	p
CI50 (µg/mL)	16B	2	0.21	0.21	17.38	0.0429
CI50 (µg/mL)	35B	2	0.29	0.29		
CI50 (µg/mL)	40B	2	0.29	0.29		
CI50 (µg/mL)	AB	2	0.15	0.15		
CI50 (µg/mL)	BB	2	0.17	0.17		
CI50 (µg/mL)	CB	2	0.12	0.12		
CI50 (µg/mL)	DB	2	0.32	0.32		
CI50 (µg/mL)	FB	2	0.15	0.15		
CI50 (µg/mL)	MB	2	0.18	0.18		
CI50 (µg/mL)	MO	2	0.23	0.23		

Trat.	Medias	Ranks		
CB	0.12	1.50	A	
FB	0.15	4.00	A	
AB	0.15	6.50	A	B
BB	0.17	7.50	A	B C
MB	0.18	9.00	A	B C
16B	0.21	11.50	A	B C
MO	0.23	12.50	A	B C
35B	0.29	16.75		B C
40B	0.29	17.25		B C
DB	0.32	18.50		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 6.7** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de los valores de  $CI_{50}$  de aislado de *B. sorokiniana* analizado para el fungicida fluxapyroxad (5%) + piraclostrobina (8,1%) + epoxiconazole (5%)

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Aislado	N	Medias	Medianas	H	p
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	16B	2	0.01	0.01	17.29	0.0444
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	35B	2	2.0E-03	2.0E-03		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	40B	2	0.09	0.09		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	AB	2	0.06	0.06		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	BB	2	0.01	0.01		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CB	2	0.04	0.04		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	DB	2	0.12	0.12		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	FB	2	0.07	0.07		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	MB	2	0.02	0.02		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	MO	2	0.09	0.09		

Trat.	Medias	Ranks		
35B	2.0E-03	1.50	A	
16B	0.01	4.50	A	B
BB	0.01	5.50	A	B
MB	0.02	6.50	A	B
CB	0.04	10.50	A	B C
AB	0.06	12.00	A	B C
FB	0.07	14.50		B C
MO	0.09	15.00		B C
40B	0.09	15.50		B C
DB	0.12	19.50		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 6.8** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de los valores de  $CI_{50}$  de aislado de *B. sorokiniana* analizado para el fungicida proticonazole (17,5%) + trifloxistrobin (15%) + bixafen (12,5%)

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Aislado	N	Medias	Medianas	H	p
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	16B	2	0.12	0.12	10.26	0.3289
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	35B	2	0.08	0.08		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	40B	2	0.10	0.10		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	AB	2	0.06	0.06		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	BB	2	0.07	0.07		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CB	2	0.09	0.09		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	DB	2	0.21	0.21		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	FB	2	0.13	0.13		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	MB	2	0.12	0.12		
CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	MO	2	0.11	0.11		

**Tabla 6.9** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de la variable “porcentaje de incidencia” para los ocho tratamientos

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	Medianas	H	p
Incidencia	3.00	4	72.50	75.00	17.06	0.0018
Incidencia	4.00	4	75.00	75.00		
Incidencia	5.00	4	73.75	75.00		
Incidencia	6.00	4	67.50	67.50		
Incidencia	7.00	4	2.50	0.00		
Incidencia	8.00	4	1.25	0.00		

Trat.	Medias	Ranks	
8.00	1.25	4.38	A
7.00	2.50	4.63	A
6.00	67.50	12.75	A B
3.00	72.50	16.88	B
5.00	73.75	17.38	B
4.00	71.25	19.00	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Tabla 6.10** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de la variable “porcentaje de severidad” sobre los ocho tratamientos

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	Medianas	H	p
Severidad	3.00	4	21.81	21.38	20.58	0.0008
Severidad	4.00	4	24.85	24.75		
Severidad	5.00	4	4.89	4.28		
Severidad	6.00	4	3.66	3.78		
Severidad	7.00	4	0.06	0.00		
Severidad	8.00	4	0.03	0.00		

Trat.	Medias	Ranks	
8.00	0.03	4.38	A
7.00	0.06	4.63	A
6.00	3.66	11.75	A B
5.00	4.89	13.25	A B
3.00	21.81	20.25	B
4.00	24.85	20.75	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Tabla 6.11** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de la variable “porcentaje de control” sobre los ocho tratamientos

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	Medianas	H	p
Porcentaje de Control	5.00	4	72.75	72.54	11.65	0.0065
Porcentaje de Control	6.00	4	84.41	83.69		
Porcentaje de Control	7.00	4	99.72	100.00		
Porcentaje de Control	8.00	4	99.88	100.00		

Trat.	Medias	Ranks
5.00	72.75	3.50 A
6.00	84.41	5.50 A
7.00	99.72	12.38 B
8.00	99.88	12.63 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Tabla 6.12** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de la variable “tamaño de lesión” sobre los ocho tratamientos

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	Medianas	H	p
Tamaño de lesión	3.00	4	7.44	8.00	37.38	<0.0001
Tamaño de lesión	4.00	4	8.78	9.00		
Tamaño de lesión	5.00	4	2.78	1.00		
Tamaño de lesión	6.00	4	1.78	1.00		
Tamaño de lesión	7.00	4	0.22	0.00		
Tamaño de lesión	8.00	4	0.56	0.00		

Trat.	Medias	Ranks
7.00	0.22	10.33 A
8.00	0.56	13.44 A
6.00	1.78	26.44 B
5.00	2.78	27.11 B
3.00	7.44	43.22 C
4.00	8.78	44.44 C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*



**Tabla 6.13** Prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis de la variable “número de lesión” sobre los ocho tratamientos

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	Medianas	H	p
Número de lesión	3.00	4	10.00	10.00	16.76	0.0041
Número de lesión	4.00	4	11.00	10.50		
Número de lesión	5.00	4	7.75	8.00		
Número de lesión	6.00	4	8.75	9.50		
Número de lesión	7.00	4	0.25	0.00		
Número de lesión	8.00	4	0.75	0.00		

Trat.	Medias	Ranks	
7.00	0.25	4.38	A
8.00	0.75	4.63	A
5.00	7.75	13.25	A B
6.00	8.75	16.13	B
3.00	10.00	18.00	B
4.00	11.00	18.63	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*